



<b>(51) 国際特許分類6</b> <b>C07K 16/18, G01N 33/53, 33/577, C12N 5/20 // C12P 21/08, C12N 15/06, A61K 39/395, (C12P 21/08, C12R 1:91)</b>	A1	<b>(11) 国際公開番号</b> <b>WO97/02290</b>  <b>(43) 国際公開日</b> 1997年1月23日 (23.01.97)
<b>(21) 国際出願番号</b> PCT/JP96/01820  <b>(22) 国際出願日</b> 1996年7月1日 (01.07.96)  <b>(30) 優先権データ</b> 特願平7/188480                      1995年6月30日 (30.06.95)                      JP 08/649,100                              1996年5月17日 (17.05.96)                              US  <b>(60) 法律上関連する他の国内特許文献の表示</b> <b>(63) 継続による関係</b> US                                      08/649,100(一部継続) 出願日                                      1996年5月17日 (17.05.96)  <b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b> 持田製薬株式会社(MOCHIDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)(JP/JP) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 Tokyo, (JP) 財団法人 大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE)(JP/JP) 〒565 大阪府吹田市古江台6丁目2番4号 Osaka, (JP) <b>(72) 発明者: および</b> <b>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ)</b> 白川嘉門(SHIRAKAWA, Kamon)(JP/JP) 松末朋和(MATSUSUE, Tomokazu)(JP/JP) 〒160 東京都新宿区四谷1丁目7番地 持田製薬株式会社内 Tokyo, (JP)	<b>長田重一(NAGATA, Shigekazu)(JP/JP)</b> 〒565 大阪府吹田市佐井寺2丁目21-17-511 Osaka, (JP) <b>コーマンサン(CO MAN SUNG)(HK/US)</b> 95014 カリフォルニア州 コベルチーノ ウイルキンソン エーブイイー 10952 California, (US) <b>ヴァスケズ マキシミリアノ(VASQUEZ MAXINILIANO)(CR/US)</b> 94303 カリフォルニア州 パロ アルトルイス ロード 3813 California, (US) <b>(74) 代理人</b> 弁理士 渡辺望稔, 外(WATANABE, Mochitoshi et al.) 〒101 東京都千代田区岩本町3丁目2番2号 千代田岩本ビル4階 Tokyo, (JP)  <b>(81) 指定国</b> AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO特許 (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  添付公開書類 国際調査報告書	
<b>(54)Title: ANTIFas LIGAND ANTIBODIES AND ASSAY METHOD BY USING THE SAME</b>		
<b>(54)発明の名称</b> 抗Fasリガンド抗体および該抗体を用いた測定法		
<b>(57) Abstract</b> A method for assaying, in particular, Fas ligands in a human bodily fluid by using an antiFas ligand antibody, the antibody to be used in this method, an assay reagent, an assay kit; an antiFas ligand antibody capable of highly (for example, at a ratio of 50 % or above) inhibiting apoptosis due to Fas ligands and the antiFas ligand antibody which is a humanized antibody; a hybridoma or a cell line which produces the antibody; a composition or drug which comprises as an essential component or the active ingredient at least one of the antiFas ligand antibodies; and a method for treating systemic or topical morbid conditions or diseases which are accompanied by abnormalities in the Fas antigen/Fas ligand system or in the apoptosis mediated by the Fas antigen, or induced by such abnormalities, or in which such abnormalities participate, which method comprises administering to a patient a therapeutically effective amount of the antiFas ligand antibody capable of inhibiting the apoptosis of cells in which Fas antigen expressed by the Fas ligand.		

# (57) 要約

本発明は、抗Fasリガンド抗体及び該抗体を用いた測定方法に関する。特に抗Fasリガンド抗体を用いたヒト体液中のFasリガンドの測定方法及び該測定方法に使用する抗体に関する。また、本発明は、Fasリガンドによるアポトーシスを高度に抑制する抗Fasリガンド抗体に関する。さらに、本発明は、上記の抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株に関する。

本発明の目的は、抗Fasリガンド抗体及び該抗体を用いた測定方法を提供することにある。特に抗Fasリガンド抗体を用いたヒト体液中のFasリガンドの測定方法、及び該測定方法に使用する抗体、測定試薬および測定キットを提供する。また、本発明は、Fasリガンドによるアポトーシスを高度に、例えば50%以上抑制する抗Fasリガンド抗体、およびヒト化抗体である該抗Fasリガンド抗体を提供する。さらに、本発明は、上記の抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株を提供する。本発明はまた、本発明の抗Fasリガンド抗体の少なくとも一つを必須の構成成分または有効成分として含有する組成物または医薬を提供し、ならびに、Fas抗原/Fasリガンド系の異常もしくはFas抗原を介するアポトーシスの異常を伴う、該異常により引き起こされるまたは該異常の関与する、全身性または局所性の病的状態または疾患を処置するための方法であって、FasリガンドによるFas抗原発現細胞のアポトーシスを抑制する抗Fasリガンド抗体の治療有効量を患者に投与することを含む方法をも提供する。

## 情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	セントルシア	PT	ポルトガル
AN	アンдорラ	EE	エストニア	LK	スリランカ	RO	ルーマニア
AU	オーストラリア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	FI	フィンランド	LS	レソト	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FR	フランス	LT	リトアニア	SG	シンガポール
BB	バルバドス	GA	ガボン	LU	ルクセンブルグ	SI	スロベニア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
BF	ブルキナ・ファソ	GE	グルジア	MC	モナコ	SN	セネガル
BG	ブルガリア	GN	ギニア	MD	モルドヴァ共和国	SZ	スワジランド
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	MG	マダガスカル	TD	チャド
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	MK	マケドニア旧ユーゴスラ	TG	トーゴ
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CA	カナダ	IL	イスラエル	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CC	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MR	モリタニア	TR	トルコ
CG	コンゴ	IT	イタリア	MW	モザンビーク	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NL	オランダ	US	合衆国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CU	キューバ	KR	大韓民国	NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン				

## 明 細 書

## 発明の名称

抗F a s リガンド抗体および該抗体を用いた測定法

## 技術分野

本発明は、抗F a s リガンド抗体及び該抗体を用いた測定方法に関する。特に抗F a s リガンド抗体を用いたヒト体液中のF a s リガンドの測定方法及び該測定方法に使用する抗体に関する。また、本発明は、F a s リガンドによるアポトーシスを高度に抑制する抗F a s リガンド抗体に関する。さらに、本発明は、上記の抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株に関する。

## 背景技術

ヒトF a s リガンドは、F a s 抗原を発現する細胞に対してアポトーシスを誘導する生体内分子として、長田等により報告されたポリペプチドである (Tomohiro Takahashi等、International Immunology、6巻、1567-1574頁、1994年)。ヒトF a s リガンドは、TNFファミリーに属する分子量約40 kDのII型膜蛋白質で、TNFと同様に、生体内で3量体を形成すると考えられている (Masato Tanaka等、EMBO Journal、14巻、1129-1135頁、1995年)。また、ヒトF a s リガンドはラットF a s リガンド (Takashi Suda等、Cell、75巻、1169-

1178頁、1993年)やマウスFasリガンド(Tomohiro Takahashi等、Cell、76巻、969-976頁、1994年)と細胞外領域において高いホモロジーを有しており、ヒトFasリガンドはヒトFas抗原のみでなくマウスFas抗原をも認識し、アポトーシスを誘導することができる。逆に、ラットFasリガンドおよびマウスFasリガンドは、ヒトFas抗原を認識してアポトーシスを誘導することができる。

もともと細胞のアポトーシスという現象は、生体の恒常性の維持に深い関わりをもつものとして注目されていたが、上記のようにFasリガンドが異なる種間でホモロジーを有することから、Fasリガンド-Fas抗原を介したアポトーシスは生体の恒常性の維持に極めて重要な役割を担っているものと考えられる。

特に最近、Fasリガンド、Fas抗原の異常と自己免疫疾患との関係について興味ある報告がなされた。すなわち、自己免疫疾患のモデルマウスの1系統であるMRL-lpr/lprではFas抗原遺伝子に変異が生じており、このような変異の生じたFas抗原遺伝子を発現している細胞ではアポトーシスが起きない(Rie Watanabe-Fukunaga等、Nature、356巻、314-317頁、1993年およびAdachi M.等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90巻、1993年)。一方、自己免疫疾患のモデルマウスの他の系統であるC3H-gld/gldでは、Fasリガンド遺伝子に変異が生じており、gldマウスのFasリガンドはアポトーシス誘導活性を持たない。この変異とは、遺伝子のポイントミューテーションであり、その結果、Fasリガンドの細胞外領域のC末端より数えて7番目のアミ

ノ酸が他のアミノ酸に変化している。(Tomohiro Takahashi 等、Cell、76巻、969-976頁、1994年)。このようなgldマウスのFasリガンドは、Fas抗原に結合することができない(Fred Ramsdell等、Eur. J. Immunol、24巻、928-933頁、1994年)。

これらの事実から、ヒトにおける自己免疫疾患のある種のものは、Fas抗原もしくはFasリガンドの異常によって、本来アポトーシスを起こして生体内から除去されるべき自己反応性のT細胞が残存するために生じるのであらうと考えられるようになった。

最近では、リウマチにおける滑膜細胞の異常増殖も、これらの細胞で正常にアポトーシスが生じないために起こるのではないかと考えられている。また、コバヤシ N. (Kobayashi N.) 等は、エイズウイルス感染によりT細胞膜上にFas抗原の発現が誘導されるので(日経サイエンス、6巻、34-41頁、1993年)、エイズウイルス感染時におけるT細胞の減少もFasリガンドを介したものであると予想している。

このようにFasリガンド-Fas抗原を介したアポトーシスと疾患との関わりが明らかになるにつれて、アポトーシスの異常を伴う疾患、すなわち、上記自己免疫疾患やリウマチ、エイズ等の治療に、FasリガンドもしくはFas抗原を応用することが期待されてきている。

また、長田らは、Fasリガンドに対する抗体を取得し、該抗体がアポトーシスを抑制しうることを報告してきた(Masato Tanaka等、EMBO Journal、14巻、1129-1135頁、1995年および国際特許

出願公開公報WO 95/13293)。

## 発明の開示

前述のように長田らは鋭意研究を重ね、F a s リガンドを単離し、また、それに対する抗体を作製し、報告してきた。

しかしながら、実際にヒト体液中に存在するF a s リガンドを測定した報告はなく、ヒト体液中に可溶性のF a s リガンドが存在することも確認されていなかった。通常F a s リガンドのような生理活性サイトカイン類は、局所において微量産生され、局所で作用すると考えられている。また、一般的に半減期が短く、作用した後は速やかに組織または血中から除去される。よって、必ずしも末梢血中等で容易に検出可能であるとはいえない。F a s リガンドは、元々膜貫通(結合)蛋白質として報告されており、ある特殊な条件下では細胞から遊離することが*in vitro*の実験で示されている(Masato Tanaka等、EMBO J., 14巻、1129-1135頁、1995年)が、生理的な状態でしかも生体内でそのような現象が起きていることは知られておらず、ヒト体液中にF a s リガンドの存在することも未知であった。また仮に存在していたとしても、上記理由から、その濃度は極めて低いものと予想され、これを測定することは相当に困難であると考えられていた。また、体液中には免疫学的測定における種々の妨害物質の存在の可能性がある、高感度かつ特異性の高いF a s リガンド測定系およびそれに適した抗体の開発が必要であった。また、F a s リガンドは種々の疾患との関連が示唆されており、それらの疾患を診断する一つの手段として体液中のF a s リガンド濃度を測定することが臨床上有用と考えられ

ている。しかし、いかなる疾患で体液中のF a s リガンド濃度が変動しているかについては未だ報告がない。さらに将来的にF a s リガンドのようなアポトーシスを誘導する物質の投与が有用と予想されている疾患の患者にF a s リガンドを投与した場合、またはF a s リガンドの活性あるいは発現に影響を与えるような物質を投与した場合、血中濃度のモニタリングまたは治療効果の判定のために体液中のF a s リガンド濃度を測定することが必要であり、高感度かつ特異的なF a s リガンドの測定方法が待望されていた。また、中和抗体については、より中和活性の高い抗体およびその特性の解明が望まれており、特に治療等の生体内における適用を考慮した場合、より低容量でF a s リガンドによるアポトーシスを抑制しうる抗体が有効性および安全性の面から強く望まれていた。

不運にも、非ヒトモノクローナル抗体、例えばマウス抗体の使用は、ヒトの治療において、特に以下に説明するような繰り返しの治療療養法においてある種の欠点を有する。マウスモノクローナル抗体は、例えば、比較的短い循環半減期を有し、そしてヒトに用いられた場合は、他の重要な免疫グロブリンの機能的特性を欠く。

恐らく更に重要には、非ヒトモノクローナル抗体は、ヒト患者体中に注入されたときに免疫原性となるアミノ酸配列の実質的な長さを含む。多くの研究により、外来の抗体の注入の後、患者によって引き起こされた抗体に対する免疫応答が、非常に強くなり得て、最初の処置後の抗体の治療的有用性を本質的に排除してしまうと示されている。更に、種々の疾患を治療するために、益々多数の種々のマウス又は他の（ヒトに）抗原性のモノクローナル抗体が開発されると予想されるので、いずれかの異なった非ヒト抗体を用いた最初の又は数回の処置

の後、それに続く関連のない療法のための処置でさえ、交叉反応性のために、効果がなかったり、またそれ自身が危険であることがあり得る。

いわゆる「キメラ抗体」（例えば、ヒト定常領域に連結されたマウス可変領域）の製造が幾分か成功であると証明されている一方、著しい免疫原性の問題が残っている。一般的に、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を用いて F a s リガンドに反応性のヒト免疫グロブリンを生産することは、多くの抗原の場合と同様に、非常に困難であろう。同様に、いわゆる「ヒト化」または「再形成」抗体（例えば、ジョーンズら、*ネーチャー* 321 : 522-525 (1986) ; シャールマンら、*J. Immunol.* 147 : 4366-4373 (1991) ; ケッテルボロフ、*プロテイン エンジニアリング* 4 : 773-783 (1991) ; ゴールマンら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 : 4181-4185 (1991) ; テンペストら、*バイオテクノロジー* 9 : 266-271 (1991) ; リーチマンら、*ネーチャー* 332 : 323 (1988) 及びヨーロッパ特許公開第 0 2 3 9 4 0 0 号公報、これらの引例はそれぞれ本明細書の一部と成す、参照。)を生産するために組換え DNA 技術を利用することは、部分的には、得られる免疫グロブリンの予期し得ない結合親和性のために一定の結果を与えない。

さらに、体液中の F a s リガンドをより詳細に検討するため、また F a s リガンドの機能を解析するため、特定の F a s リガンド由来ペプチドと反応する抗体、すなわち F a s リガンド内の結合部位の明らかな抗体の取得が待望されていた。

本発明の目的は、抗 F a s リガンド抗体及び該抗体を用いた測定方法を提供す



ることにある。特に抗F a s リガンド抗体を用いたヒト体液中のF a s リガンドの測定方法、及び該測定方法に使用する抗体、測定試薬および測定キットを提供する。また、本発明は、F a s リガンドによるアポトーシスを高度に、例えば、50%以上抑制する抗F a s リガンド抗体、およびヒト化抗体である該抗F a s リガンド抗体を提供する。さらに、本発明は、上記の抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株を提供する。本発明はまた、本発明の抗F a s リガンド抗体の少なくとも一つを必須の構成成分または有効成分として含有する組成物または医薬を提供し、ならびに、F a s 抗原/F a s リガンド系の異常もしくはF a s 抗原を介するアポトーシスの異常を伴う、該異常により引き起こされるまたは該異常の関与する、全身性または局所性の病的状態または疾患を処置するための方法であって、F a s リガンドによるF a s 抗原発現細胞のアポトーシスを抑制する抗F a s リガンド抗体の治療有効量を患者に投与することを含む方法をも提供する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、ヒトF a s リガンド細胞外領域上のエピトープ領域と推定された部分とそのアミノ酸配列を示す模式図である。

図2は、抗M52ペプチドモノクローナル抗体を用いたF a s リガンドのウェスタンブロッティングによる結果を示す図面代用写真である。

図3は、アポトーシス誘導活性に及ぼす抗M52ペプチドモノクローナル抗体の影響を示すグラフである。

図4は、抗F a s リガンド抗血清（ロット8-2）の抗体価を示すグラフであ

る。

図5は、F919-9-18モノクローナル抗体によるアポトーシス抑制活性を示すグラフである。

図6は、酵母由来のFasリガンド細胞外領域のゲルろ過クロマトグラフィーの結果を示すグラフである。

図7は、ポリクローナル抗体を用いたサンドイッチEIA系の標準曲線を示すグラフである。

図8は、サンドイッチEIA系における正常ヒト血清の影響を示すグラフである。

図9は、各種疾患患者血清中のFasリガンドの測定値を示すグラフである。

図10は、マウスF919抗体の軽鎖可変領域のcDNA配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。CDRに下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二重下線を引いた。

図11は、マウスF919抗体の重鎖可変領域のcDNA配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。CDRに下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二重下線を引いた。

図12は、ヒト化F919抗体(version 2)の軽鎖可変領域のcDNA配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。CDRに下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二重下線を引いた。

図13は、ヒト化F919抗体の重鎖可変領域のcDNA配列及び翻訳アミノ酸配列を示す図である。CDRに下線を引き、成熟鎖の1番目のアミノ酸には二

重下線を引いた。

図14は、マウス及びヒト化F919抗体 (version1) の競合的結合を示すグラフである。Fasリガンドを発現するトランスフェクタント1A12細胞とともに、放射標識されたトレーサーマウスF919抗体の存在下に、順次増加させた量のマウス又はヒト化競合物抗体を、インキュベートした。そして結合／遊離放射活性の比率を測定した。結果を2つの試料の平均値で示す。

図15は、マウス及びヒト化F919抗体 (version2) の競合的結合を示すグラフである。Fasリガンドを発現するトランスフェクタント1A12細胞とともに、放射標識されたトレーサーマウスF919抗体の存在下に、順次増加させた量のマウス又はヒト化競合物抗体を、インキュベートした。そして結合／遊離放射活性の比率を測定した。結果を2つの試料の平均値で示す。

図16は、マウスならびにヒト化F919抗体 (version1) IgG1 (G1v1) およびIgG4 (G4v1) のアポトーシス抑制活性を示すグラフである。結果を3つの試料の平均値で示す。

図17は、マウスならびにヒト化F919抗体 (version2) IgG1 (G1v2) およびIgG4 (G4v2) のアポトーシス抑制活性を示すグラフである。結果を3つの試料の平均値で示す。

図18は、2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチEIA系の標準曲線を示す。

図19は、HIV感染患者パネル血清のFasリガンド濃度の推移を示すグラフである。

図20は、A型肝炎患者パネル血清のFasリガンド濃度の推移を示すグラフ

である。

図 2 1 は、B型肝炎患者パネル血清の F a s リガンド濃度の推移を示すグラフである。

図 2 2 は、C型肝炎患者パネル血清の F a s リガンド濃度の推移を示すグラフである。

発明を実施するための最良の形態

以下に本発明を詳細に説明する。

本発明は以下の抗体を提供する。すなわち、

(1) 抗 F a s リガンド中和抗体であって (以下、中和抗体と称することがある)、

① F a s リガンドによる F a s 抗原発現細胞のアポトーシスを高度に抑制する活性を有する抗 F a s リガンド抗体であって、 $30 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、より好ましくは  $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、特に好ましくは  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  において 50% 以上のアポトーシス抑制率を示す抗 F a s リガンド抗体。

② 生物活性を有する F a s リガンドの少なくともいずれか 1 つを認識する抗 F a s リガンド抗体。

③ 生物活性を有さない F a s リガンドの少なくともいずれか 1 つを認識しない抗 F a s リガンド抗体。

④ ② 及び ③ の性質を合わせ持つ抗 F a s リガンド抗体。

⑤ 該生物活性を有する F a s リガンドが後に実施例で記載する F a s リガンド

細胞外領域、遊離型F a s リガンド、F a s リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチドn d 5、n d 1 2、n d 2 0、n d 3 2 およびn d 4 2、ヒトF a s リガンドの細胞外領域の置換変異体であるL 1 7 9 Fの少なくとも何れか一つである②または④の抗F a s リガンド抗体。

⑥該生物活性を有さないF a s リガンドがF a s リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチドn d 4 9、ヒトF a s リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるc d 1 7 9 または硫酸塩析により凝集変性したF a s リガンドの少なくとも何れか一つである③④または⑤の抗F a s リガンド抗体。

⑦①および②の性質を合わせ持つ抗F a s リガンド抗体。

⑧少なくとも $10^7 M^{-1}$ 以上、好ましくは $10^8 M^{-1}$ 以上、より好ましくは $10^9 M^{-1}$ 以上、さらに好ましくは $10^{10} M^{-1}$ 以上の親和定数でF a s リガンドと結合する抗F a s リガンド抗体。

⑨少なくとも $10^7 M^{-1}$ 以上、好ましくは $10^8 M^{-1}$ 以上、より好ましくは $10^9 M^{-1}$ 以上、さらに好ましくは $10^{10} M^{-1}$ 以上の親和定数でF a s リガンドと結合する①ないし⑦のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体。

⑩図10または11に示される相補性決定領域(CDR)の少なくとも一つ、好ましくはすべてを含有する抗F a s リガンド抗体。

⑪図10または11に示される相補性決定領域(CDR)の少なくとも一つ、好ましくはすべてを含有する、①ないし⑨のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体。

⑫ヒトF a s リガンドに特異的に結合する非ヒト供与体の免疫グロブリン(I g)からの少なくとも一つ、好ましくはすべてのCDRおよびヒト受容体免

疫グロブリンからの少なくとも一つ好ましくはすべてのフレームワーク領域を含有するヒト化免疫グロブリンである抗F a s リガンド抗体。

⑬⑫に記載のヒト化免疫グロブリンである①ないし⑪のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体。

⑭前記非ヒト供与体 I g が①ないし⑪のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体である⑫または⑬に記載の抗F a s リガンド抗体。

⑮前記非ヒト供与体 I g が、マウスF 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体である⑭に記載の抗F a s リガンド抗体。

ここで中和抗体とは、F a s リガンドによるF a s 抗原発現細胞のアポトーシスを抑制する活性を示す抗体をいい、後述する実施例の1 - 3 に記載の方法または公知の方法で測定するアポトーシス（これは放射活性または特異的溶解率（specific lysis, %）等で表現される）が、対照群例えば無添加群と比較して低値であるものをいう。具体的には、以下の式で計算されるアポトーシス抑制率が10%以上、好ましくは30%以上、より好ましくは50%以上、さらに好ましくは90%以上である抗体である。

$$\text{アポトーシス抑制率(\%)} = \frac{\text{対照群の放射活性} - \text{抗体添加群の放射活性}}{\text{対照群の放射活性}} \times 100$$

また、F a s リガンドの生物活性とは、F a s 抗原発現細胞のアポトーシスを誘導または抑制する活性をいい、後述する実施例の1 - 3 に記載の方法または公知の方法で測定される。

また、抗F a s リガンド抗体とは、F a s リガンドを認識する活性、また

はF a s リガンドと反応する活性を有する抗体をいい、例えば本明細書に記載のいずれかの方法または公知の方法で抗原であるF a s リガンド（例えばF a s リガンド細胞外領域）との結合が確認される抗体が含まれる。

本発明はまた以下の抗体を提供する。すなわち、

(2) 特定のF a s リガンド由来ペプチドに対する抗F a s リガンド抗体であって、

①該ペプチドと特異的に反応する抗F a s リガンド抗体。

②該ペプチドが配列表の配列番号1～8のいずれかである①の抗F a s リガンド抗体。

③該ペプチドが配列表の配列番号1または6である①の抗F a s リガンド抗体。

④該ペプチドが配列表の配列番号1である①の抗F a s リガンド抗体。

⑤該ペプチドが配列表の配列番号1中に記載されるアミノ酸の番号で1～9または10～20に対応する部分のペプチドである④の抗F a s リガンド抗体。

すなわち、本発明(1)の抗体はF a s リガンドの生物活性発現に重要なエピトープを認識する抗体であり、該エピトープは生物活性を有するF a s リガンド、例えば、F a s リガンド細胞外領域、遊離型F a s リガンド、F a s リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチドn d 5、n d 1 2、n d 2 0、n d 3 2およびn d 4 2、ヒトF a s リガンドの細胞外領域の置換変異体であるL 1 7 9 F等には表現されているが、生物活性を有さないF a s リガンド、例えばF a s リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチドn d 4 9、ヒトF a s リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるc d 1 7 9および実

実施例 4-1 記載の Fas リガンド細胞外領域の硫酸塩析による凝集物等には表現されていないエпитープと考えられる。また本発明は、標準的結合条件（例えば生理的食塩液または血清条件）下で後に実施例で述べるような検定法において、少なくとも  $10^7 \text{ M}^{-1}$  以上、好ましくは  $10^8 \text{ M}^{-1}$  以上、より好ましくは  $10^9 \text{ M}^{-1}$  以上、さらに好ましくは  $10^{10} \text{ M}^{-1}$  以上の Fas リガンドに対する結合親和性を有する抗 Fas リガンド抗体ならびに、図 10 および 11 に示される相補性決定領域（CDR）の少なくとも一つ、好ましくは 3 つ、より好ましくはすべてを含有する抗 Fas リガンド抗体を提供する。本発明（1）の抗体の好適な例としてはハイブリドーマ F 9 1 9-9-18 の産生するモノクローナル抗体またはこれと同一のエピトープを認識する抗体或いは該抗体とその抗原の結合を競合する抗体があげられる。本発明（1）の抗体は高度にアポトーシスを抑制することが可能である。また、Fas リガンド特に生物活性を有する Fas リガンドを認識するため、ヒト体液中の Fas リガンド、特に生物活性を有する Fas リガンドを高感度に検出する測定方法に使用可能である。

本発明（2）の抗体の好適な例としては、ハイブリドーマ F 9 1 8-7-3、F 9 1 8-9-4 および F 9 1 8-20-2 等が産生する抗体またはこれと同一のエピトープを認識する抗体或いは該抗体とその抗原との結合を競合する抗体があげられる。前記（2）⑤の抗体の内、配列番号 1 のペプチドのアミノ酸番号 1 から 9 のペプチドに特異的に反応する抗体としては F 9 1 8-7-3 が、また、アミノ酸番号 10 から 20 のペプチドに反応する抗体としては F 9 1 8-9-4 および F 9 1 8-20-2 があげられる。本発明（2）の抗体は特異的に Fas リガンドと反応し、また、その反応するペプチド部分が明らかであり、特定



のF a s リガンドと反応する。そのため、ヒト体液中のF a s リガンドを高感度に検出する測定方法に使用可能である。また、1種類または複数の特定のF a s リガンドを選択的に検出する測定方法にも使用し得る。

本発明の抗F a s リガンド抗体は、F a s リガンドまたはF a s リガンド由来ペプチドと結合する限り、モノクローナル抗体であっても、ポリクローナル抗体であってもよいが、モノクローナル抗体は特性がより明らかであるという点で好ましい。

抗体、すなわち、免疫グロブリンの構造はH鎖とL鎖とからなり、H鎖のクラスにより、5つのイソタイプ(I g G, I g A, I g M, I g D, I g E)に分けられる。このうち、I g G、I g AのH鎖はサブクラスに分けられる。本発明の抗F a s リガンド抗体は、これらの、および後述のいずれの分類の鎖を含有するものでもよく、またいずれのイソタイプに属するものであってもよい。

さらに、免疫グロブリンは例えばペプシンで分解すると、F (a b' ) 2 とF c' に別れ、パパインで分解するとF a b とF c の2つのフラグメントに分かれる。本発明の抗体は、抗原と結合するものであれば、完全な抗体分子でもその一部のフラグメントでもよい。また、本発明の抗体はキメラ抗体またはヒト抗体であってもよい。さらに、公知方法により種々の標識物を結合させた標識抗体、他の物質、例えばポリペプチドとの融合抗体及びイムノトキシン等も本発明の抗体に含まれる。

基本的な抗体の構造単位は、テトラマーを構成すると知られている。各テトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの同一のペアから成り、各ペアは、1つの“軽”鎖(約25 k D)及び1つの“重”鎖(約50～70 k D)を有する。各鎖

のNH<sub>2</sub>末端は、主として抗原認識に寄与する約100～110或いはそれ以上のアミノ酸の可変領域から始まる。各鎖のCOOH部分は、主としてエフェクター機能に寄与する定常領域を定めている。

軽鎖は、カッパ又はラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ又はイプシロンとして分類され、それぞれ抗体のイソタイプをIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEと決定づけている。軽鎖及び重鎖内では、可変領域及び定常領域が、約12或いはそれ以上のアミノ酸の“J”領域によって連結されており、重鎖はまた約10より多いアミノ酸の“D”領域を含む（一般に、ファンダメンタル イムノロジー、ポール W. 編、第7章、131-166頁、ラベンプレス、N. Y. (1984)、本引例をもって明細書の一部と成す、参照）。

各軽鎖／重鎖ペアの可変領域は、抗体結合部位を形成する。鎖は全て、3つの超可変領域（この領域はまた相補性決定領域又はCDRと呼ばれる[“免疫学的興味のプロテイン配列”、カバット E. ら、U. S. デパートメント オブ ヘルス アンド ヒューマン サービス(1987)；及びチョチア アンド レスク、J. Mol. Biol.、196:901-917(1987)、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照]）によって連結された比較的保存されたフレームワーク領域の同じ普遍的構造を示す。各ペアの2つの鎖からのCDRは、フレームワーク領域によって一列に並べられ、特異的なエピトープへの結合を可能とする。

本明細書において、「免疫グロブリン」という用語は、免疫グロブリン遺伝子によって実質的にエンコードされる1以上のポリペプチドからなる蛋白質

を云う。認識された免疫グロブリン遺伝子は、カッパ、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン及びミュー定常領域遺伝子、並びにミリアド (myriad) 免疫グロブリン可変領域遺伝子を含む。免疫グロブリンは、例えば Fv、Fab 及び F(ab')<sub>2</sub> 並びに二価抗体 (例えば、ランザベチアら、Eur. J. Immunol. 17:105 (1987)) を含む抗体の他の種々の形態で、及び一本鎖 (例えば、ヒューストンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 85:5879-5883 (1988) 及びバードら、サイエンス、242:423-426 (1988)、本引例をもって本明細書の一部と成す) にて存在しうる (一般に、フードら、Immunology (ベンジャミン、N. Y.、第2版、1984)、ハルロウ アンド レーン、Antibodies: A Laboratory Manual (コールドスプリング ハーバー ラボラトリー、1988) 及びハンカピラー アンド フード、ネーチャー、323:15-16 (1986)、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照)。

「成熟免疫グロブリン」の天然の形態は、配列中の1以上のアミノ酸の欠失、置換、挿入または付加によって長さが多少変化することはよく知られている。このように、可変領域および定常領域は、実質的な天然の修飾を受けるが、なお実質的に同一であり、かつそれらの各活性を保持しうる。

ヒト定常領域および再編成した可変領域DNAは、公知の操作法に従って種々のヒト細胞、好ましくは不死化B細胞から単離しうる。同様な方法により非ヒト材料から非ヒト免疫グロブリン配列を単離することができる。DNA配列のための材料の細胞ならびに発現および分泌のための宿主細胞は、種々の材料、例えば

アメリカン タイプ カルチャー コレクション (セルライン及びハイブリドーマのカタログ、第5版 (1985)、ロックビル、MD、本引例をもって本明細書の一部と成す) から得ることができる。

これらの「天然に存在する形態」の免疫グロブリン鎖に加えて、他の「実質的に同一な」修飾された免疫グロブリン重鎖および軽鎖が当業者に周知の種々の組み換えDNA技術を利用して容易にデザインされそして製造されうる。例えば、鎖は、いくつかのアミノ酸の置換、末端及び中間での付加や欠失等によって、その1次構造レベルにて天然の配列から変化することができる。或いは、1又はそれ以上の免疫グロブリン活性 (例えば、結合活性) を有するような、一次の抗体構造の部分のみを含むポリペプチドフラグメントを製造することができよう。特に、多くの遺伝子と同様に、免疫グロブリン遺伝子も分離した機能的領域を含有し、各領域は異なる生物活性を有することが注目される。一般に、所望のエピトープ結合成分をコードする遺伝子の修飾は、種々の良く知られた技術、例えば、特定部位の突然変異誘発 (ギルマン アンド スミス、Gene 8:81-97 (1979) 及びロバーツら、ネーチャー 328:731-734 (1987)、本引例を持って本明細書の一部と成す、参照) によって、容易に達成されよう。

より好ましい本発明の態様において、エピトープ結合成分は、「キメラ」または「ヒト化」された免疫グロブリン遺伝子によってコードされる (C o および Queen Nature、351巻、501頁、1991年)。

キメラ抗体は、軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子が、典型的には遺伝子工学により、異なった種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから構成されている抗体で

ある。例えば、マウスモノクローナル抗体からの遺伝子の可変（V）セグメントは、ヒト定常（C）セグメント、例えば、 $\gamma_1$  及び  $\gamma_4$  と連結されうる。従って、他の哺乳動物種も用いられ得るけれども、典型的な治療用キメラ抗体は、マウス抗体からのV又は抗原結合ドメイン及びヒト抗体からのC又はエフェクタードメインから成るハイブリッド蛋白質である。

本明細書において、「フレームワーク領域」という用語は、カバットら（前掲）による定義の如く、単一種中の種々の免疫グロブリンの中で、比較的保存されている（即ち、CDR以外の）免疫グロブリン軽鎖及び重鎖可変領域の部分を云う。本明細書において、「ヒトフレームワーク領域」とは、自然に生じるヒト抗体のフレームワーク領域と又はいくつかのこのような抗体の共通配列と実質的に同一（約85%又はそれ以上）であるところのフレームワーク領域である。

本明細書において、「ヒト化免疫グロブリン」という用語は、ヒトフレームワーク、非ヒト抗体からの少なくとも一つのCDRを含む免疫グロブリンを云い、その中に存在する何らかの定常領域は、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一である、即ち少なくとも約85～90%、好ましくは少なくとも95%同一である。従って、恐らくCDRを除く、ヒト化免疫グロブリンの全ての部分は、1以上の天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。例えば、ヒト化免疫グロブリンは、キメラマウス可変領域／ヒト定常領域抗体を含まない。

より好ましい本発明の態様において、Fasリガンドに特異的に反応するヒト化免疫グロブリンである抗Fasリガンド抗体が提供される。これらの免疫グロ

ブリンは、より特異的には、本発明は、複数の、好ましくは一つのヒト受容体（アクセプター）免疫グロブリンからのフレームワーク領域（FR）の少なくとも一つ、好ましくは一方の鎖の全て（4つ）、より好ましくはすべて（各鎖について4つ）を含有し、そして、F a s リガンドに特異的に結合する非ヒト、好ましくは齧歯類、より好ましくはマウス供与体免疫グロブリンからの1以上、好ましくはすべて（各鎖について3つ）の相補性決定領域（CDR）を含有するヒト化免疫グロブリンである、本発明の抗体のいずれかに従う抗F a s リガンド抗体を提供する。該免疫グロブリンは、軽鎖／重鎖複合体の2つのペアを有することができ、少なくとも一つの鎖、特に重鎖は、ヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結された、1以上、好ましくは全て（3つ）の供与体（マウス）免疫グロブリンの相補性決定領域を含む。例えば、供与体（マウス）相補性決定領域は、追加の自然に随伴する供与体（マウス）アミノ酸残基と共に又はなしで、ヒトフレームワーク領域中に導入されて、約 $10^7 \text{ M}^{-1}$ より強い親和性レベルにてF a s リガンドに結合できるヒト化免疫グロブリンを製造できる。これらのヒト化免疫グロブリンはまた、CDRを供与するマウスモノクローナル抗体のF a s リガンドへの結合をブロックできる。好ましい実施態様において、1以上のCDRが本発明の抗体、より好ましくは本発明（1）の抗体のいずれかに従う非ヒト供与体抗体、特にマウスF 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体から由来し、そしてヒト化免疫グロブリンはI g G 1 又はI g G 4 イソタイプである。さらに明確な例としては、本発明のヒト化免疫グロブリンは、各々、配列表の配列番号1 1、1 3、1 5、1 9、2 1 または2 3 のいずれかのアミノ酸配列を含有するまたは該アミノ酸配列からなるCDRの少なくとも一つ、好ましくはすべて（各

鎖3つ)を含有するものである。ヒト化免疫グロブリンにおける各CDRおよびフレームワークの位置は元の供与体免疫グロブリンにおける位置と対応していることが望ましい。

一般に、本発明のヒト化抗体は、ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク及び供与体免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワーク間において、65%以上95%以下、好ましくは70%以上90%以下の相同性(即ち、配列同一のパーセント)が好ましい。標準的には、同じヒト抗体からの重鎖及び軽鎖が、フレームワーク配列を提供するために選択されて、2つの鎖の集合における非適合性の可能性を減少させるが、異なる2以上のヒト抗体から由来してもよい。

ヒトフレームワーク領域に関しては、CDRを得る非ヒト免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域アミノ酸配列をヒト免疫グロブリン配列コレクション中の対応する配列と比較し相同性の高い配列を選び用いる。好ましくは、フレームワークアミノ酸配列の相同性は60%以上、より好ましくは65%以上である。また、好ましくは、受容体免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列は、供与体免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列と最も相同なヒト免疫グロブリン重鎖可変領域配列の代表的コレクション中の5つ、より好ましくは3つの中にある。ヒト化免疫グロブリンの設計は、以下のように行うことができる。

1) アミノ酸が以下の(a)～(c)のカテゴリーに該当する場合は、用いられるヒト免疫グロブリン(受容体免疫グロブリン)のフレームワークアミノ酸はCDRを供与する非ヒト免疫グロブリン(供与体免疫グロブリン)由来のアミノ酸で置換される。

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がヒト免疫グロブリンのその位置に稀であり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に典型的である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つに一次配列上近接もしくは隣接している；または、

(c) 該アミノ酸が供与体もしくはヒト化免疫グロブリンの三次元モデルにおいてCDRの約5、好ましくは4、より好ましくは3オングストローム以内に原子を有する (Co等 Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869, 1991)。

2) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸および供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に稀である場合、ヒトフレームワークのその位置に典型的であるアミノ酸に置換する。

ヒト化免疫グロブリンの製造の詳細な説明については、クイーンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029 (1989)、国際特許出願公開公報WO90/07861およびWO92/11018、Co等 Proc, Natl. Acad. Sci. USA, 88, 2869

(1991)、CoおよびQueen Nature、351巻、501頁、1991年、ならびに、コーら、J. Immunol. 148:1149 (1992) (これらの引例をもって本明細書の一部と成す) が参照される。

一般に、全ての又は殆どのアミノ酸の置換が上記基準を満たしているのが望ましい。しかしながら、個々のアミノ酸が上記基準にあっているかどうかについては曖昧であることもあり、そして、代わりの様々な免疫グロブリンが製造され、



その内の一つはその特定の置換を有するものもあるが、有さないものもある。本発明のヒト化抗体は、通常、少なくとも1、3、5及び更に通常は7つの、対応する供与体（マウス）軽鎖フレームワーク残基または他のアミノ酸残基での置換を含む。そして、ヒトフレームワークがE $\mu$ 抗体由来である場合、特にCDR供与体がマウスF919-9-18である場合、それらの置換は表4および5に示される位置での置換を含む。ヒト化抗体はまた、通常、少なくとも1、3、5、7、9、11、13及び更に通常は16の位置において、対応する供与体（マウス）重鎖フレームワーク残基での置換を含む。そして、ヒトフレームワークがE $\mu$ 抗体由来である場合、特にCDR供与体がマウスF919-9-18である場合、それらの置換は表4および5に示される位置での置換を含む。これらの位置は、通常、典型的なアミノ酸残基を有するヒト免疫グロブリンの等価位置からのアミノ酸またはその同類のアミノ酸で置換されてもよい。

また、フレームワーク領域中のいくつかの位置のアミノ酸は抗原と直接相互作用、例えば非共有結合的に接触することができ、これらの位置も上記置換の対象となるが、特に、重鎖の26から30の位置のアミノ酸は立体構造上超可変ループに含まれるとされており、(チョチアおよびレスク、J. Mol. Biol.、196:901-917(1987))、その意味ではCDRと同様に移植することも可能である。

ヒト化抗体は、ヒトの治療における使用のために、マウスに比べ、そしていくつかの場合にはキメラ抗体に比べ、少なくとも3つの潜在的な利点を有する。

1) エフェクター部分がヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用しうる（例えば、補体依存性細胞障害(CDC)又は抗体依存性細胞障

害（ADCC）による、より効率的な標的細胞の破壊）。

2) ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワーク又はC領域を異物として認識せず、従って、このような注入された抗体に対する抗体応答は、全部が異物であるマウス抗体又は一部分が異物であるキメラ抗体より少ない。

3) 注入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも非常に短い、ヒト体内での循環における半減期を有すると報告されている（ショー、D. ら、J. Immunol. 138: 4534-4538 (1987)）。注入されたヒト化抗体は、恐らく、自然に生じるヒト抗体の半減期とより近い半減期を有し、より少量、又はより少ない頻度の投与量を与えることを可能とする。

本発明の抗Fasリガンド抗体には、Fas抗原とFasリガンドの結合に影響する物およびしない物が含まれる。本発明(1)の抗Fasリガンド抗体のように、Fasリガンドに結合し、かつアポトーシスを誘導しない場合には、生体内のFasリガンドに拮抗する物質として、アポトーシスを人為的に抑制するために使用することができる。また、本発明の抗Fasリガンド抗体は以下に示すFasリガンドの測定方法のために、ならびに該測定方法のための試薬およびキットの構成成分として、使用される。

また、本発明は以下の測定方法、測定試薬及び測定キットを提供する。すなわち、

(3) 抗Fasリガンド抗体を用いたヒト体液中のFasリガンドの測定方法、測定試薬及び測定キットであって、

① (1) または (2) の何れかに記載の抗体のうちの少なくとも1つを用いる、または含有することを特徴とするFasリガンドの測定方法、測定試薬及

び測定キット。

②競合法による①記載の方法、測定試薬及び測定キット。

③サンドイッチ法による①記載の方法、測定試薬及び測定キット。

④同一または異なる2種類以上の中和抗体を組み合わせて用いる、または含有する①-③に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

⑤同一または異なる2種類以上の(2)記載の抗体を組み合わせて用いる、または含有する①-③に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

⑥中和抗体および(2)記載の抗体を組み合わせて用いる、または含有する①-③に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

⑦前記中和抗体が受託番号B P - 5 5 3 5のハイブリドーマの産生するF 9 1 9 - 9 - 1 8である⑥に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

⑧前記(2)記載の抗体が配列表の配列番号1のペプチドに特異的に反応する抗体である⑥または⑦に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

⑨前記(2)の抗体が配列表の配列番号1のアミノ酸番号11-20のペプチドに特異的に反応する抗体である⑧に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

⑩前記(2)の抗体が、F 9 1 8 - 9 - 4またはF 9 1 8 - 2 0 - 2である⑧または⑨に記載の方法、測定試薬及び測定キット。

上記①から⑩に記載の方法、測定試薬及び測定キットにおいて、1又は2種以上の他の抗F a sリガンド抗体を併用してもよい。

中和抗体、特に本発明の中和抗体は、F a sリガンドの生物活性に重要なF a sリガンド上の構造またはエピトープを認識していると考えられるので、中和抗体を用いた本発明の測定方法は、検体特にヒト体液中のF a sリガンド、特

に生物活性を有するF a s リガンドを高感度に測定することができる。また、該方法は検体中のF a s リガンドの生物活性を試験する方法として生物試験法（バイオアッセイ）の代替法としても使用可能である。前述のようにF a s リガンドは生理的には3量体として存在または機能することが示唆されており、実施例で記載されるように同一の抗体同士の組み合わせにおいてもサンドイッチ法による測定が可能である。

また、本発明（2）の抗体は、F a s リガンドと特異的に反応し、また、その反応するペプチド部分が特定されているため、本発明（2）の抗体を用いた測定方法は、検体特にヒト体液中のF a s リガンドを高感度に測定することができる。また、1種類または複数の特定のF a s リガンドを選択的に測定することも可能である。

また、中和抗体、特に本発明の中和抗体と本発明（2）の抗体とを組み合わせることにより、生物活性を有する1種類または複数の特定のF a s リガンドを選択的に測定することも可能である。

さらに、複数の本発明の測定方法で同一の検体を同時に測定することによりF a s リガンドの全量および特定のF a s リガンドの量ならびにそれらの量比を測定することも可能であり、例えば、特定の疾患または病態におけるF a s リガンドの量的変化のみでなく、質的变化をも測定することが可能である。

本発明の測定方法の対象試料は必ずしも体液に限定されないが、本方法は体液、特にヒト体液中のF a s リガンドを測定するために特に適している。体液としては例えば、好ましくは、血液、血漿、血清、尿、髄液、リンパ液、唾液、腹水、胸水より選ばれる試料である。

本発明の抗体が認識する抗原であるF a s リガンドおよび本発明の測定方法で検出されるF a s リガンドは、実施例に示すように、それが、F a s 抗原に結合するかしないかに関わらず、また、アポトーシスを誘導するかしないかに関わらず、F a s リガンド、特にヒトF a s リガンド由来のものであれば、生体内の内因性F a s リガンドならびに外因性のF a s リガンドの何れでもよく、それらは天然物から由来したもの、遺伝子工学的に作製したもの、または化学的に合成したもの等、何れもが該当する。糖鎖を有するもの、有さないものいずれもが含まれる。例えば、F a s リガンド発現細胞、F a s リガンド、F a s リガンド細胞外領域、遊離型F a s リガンドまたはF a s リガンド由来ペプチド断片、あるいはF a s リガンドの1 アミノ酸以上を欠失もしくは置換された欠失体及び置換体ならびに少なくともF a s リガンドの一部を有する融合蛋白質等が含まれる。

本発明の測定方法を用いて健常人及び種々の疾患を有する患者の体液中のF a s リガンドを測定することができる。また、本発明により初めて体液中のF a s リガンド濃度が明らかとなった。例えば、肝炎、H I V感染症または自己免疫疾患では健常人より高値を示し、これらの疾患の診断に応用できる。さらにF a s リガンドによるアポトーシスに影響を与えない抗F a s リガンド抗体は、体内診断にも応用可能である。

さらに本発明は以下の方法、測定試薬および測定キットを提供する。

(4) 抗F a s リガンド抗体を用いる、または含有する体液中のF a s リガンドの測定方法、測定試薬および測定キットであって、

①F a s リガンドの増加、減少および／またはF a s 抗原／F a s リガンド系の異常の予知、検出、およびそれらを伴う疾患および該疾患に付随する病態の予

知、検出または診断のために使用される体液中のF a s リガンドの測定方法、測定試薬および測定キット。

②F a s 抗原／F a s リガンド系の異常を伴う疾患においてF a s 抗原／F a s リガンド系の異常に起因した全身または局所における病態を検出するための方法、測定試薬および測定キット。

③（３）記載の測定方法による①または②に記載の方法、測定試薬および測定キット。

④該疾患が自己免疫疾患、肝炎またはH I V 感染症である①－③に記載の方法、測定試薬および測定キット。

さらに本発明は以下のハイブリドーマまたは細胞株を提供する。

（５）抗F a s リガンド抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株。

①（１）および（２）に記載の抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株。

②受託番号がF E R M B P - 5 5 3 3、F E R M B P - 5 5 3 4またはF E R M B P - 5 5 3 5であるハイブリドーマ（本明細書では、各々F 9 1 8 - 7 - 3、F 9 1 8 - 9 - 4、F 9 1 9 - 9 - 1 8と表示、いずれも平成7年6月22日に日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所に原寄託され、平成8年5月9日にブタペスト条約に基づき移管）。

本発明は、前記した本発明の抗F a s リガンド抗体の少なくともいずれかひとつを活性成分または有効成分として含有する新規組成物または医薬を、ならびに、F a s 抗原／F a s リガンド系の異常もしくはF a s 抗原を介するアポ

トーシスの異常を伴う、該異常により引き起こされるまたは該異常の関与する、全身性または局所性の病的状態または疾患を処置するための方法を提供する。該方法は、本発明の抗F a s リガンド抗体、特にF a s 抗原発現細胞のF a s リガンドによるアポトーシスを抑制する抗F a s リガンド抗体の少なくともいずれか一つの治療有効量を患者に投与する工程を含む。

以下に、本発明の抗F a s リガンド抗体の取得方法等についてさらに説明する。

本発明の抗F a s リガンド抗体を作製するための抗原としては、実施例に示すように、それが、F a s 抗原に結合するかしないかに関わらず、また、アポトーシスを誘導するかしないかに関わらず、F a s リガンド、特にヒトF a s リガンド由来のペプチドを含むものであれば、天然物から由来したもの、遺伝子工学的に作製したもの、または化学的に合成したもの等、何れも本発明の抗体を作製するための抗原として使用することができる。糖鎖を有するもの、有さないものいずれもが含まれる。例えば、F a s リガンド発現細胞、F a s リガンド全長、F a s リガンド細胞外領域、遊離型F a s リガンドまたはF a s リガンド由来部分ペプチド断片、あるいはF a s リガンドの1 アミノ酸以上が欠失もしくは置換された欠失体及び置換体ならびに少なくともF a s リガンドの一部を有する融合蛋白質等が含まれる。

本発明の抗F a s リガンド抗体は、それがポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であっても、公知方法を参考にして得ることができる（例えば、免疫実験操作法、日本免疫学会編、日本免疫学会発行、参照）。以下に簡単に説明する。

当該抗F a s リガンド抗体を得るには、まず動物に、免疫抗原としてF a s リガンドまたはその部分ペプチドを必要に応じてフロイントの完全アジュバント (F C A) や不完全アジュバント (F I A) 等の適切なアジュバントとともに接種し、必要があれば2～4週間の間隔で追加免疫する。追加免疫後、採血を行い抗血清を得る。抗原として用いるF a s リガンドは、それが抗体の作製に使用しうる精製度のものであればいかなる方法で得られたものであってもよい。

免疫抗原として使用するポリペプチドが、低分子のポリペプチド、すなわち約10～20アミノ酸からなるポリペプチドである場合には、それをキーホールリンペットヘモシアニン (K L H) 等のキャリアと結合させて抗原として使用すればよい。F a s リガンドで免疫する動物はいかなるものであっても良いが、好ましくは通常当業者で免疫学的な実験に使用されるラット、マウス、ウサギ、ハムスター、ヒツジ、ウマ、ニワトリ、ヤギ、ブタ、ウシ等から、目的の抗体を産生しうる動物種を選択して使用することが好ましい。

ポリクローナル抗体は、得られた抗血清を精製することによって得る事が出来る。精製は、塩析、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知方法を適宜組み合わせて行えば良い。

モノクローナル抗体を得るには以下のように行う。すなわち、免疫した動物から脾細胞もしくはリンパ球等の抗体産生細胞を採取し、ポリエチレングリコール、センダイウイルス、電気パルス等を用いる方法によって、ミエローマ細胞株等と融合し、ハイブリドーマを作製する。その後、F a s リガンドに結合する抗体を産生しているクローンを選択して培養し、その選択されたクローンの培養上清を精製することによって得る。精製は、塩析、イオン交換クロマトグ



ラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の方法を組み合わせて行う。

また、遺伝子工学的な方法により当該抗F a s リガンド抗体を得る。例えば、F a s リガンドまたはその部分ペプチドで免疫した動物の脾細胞、リンパ球あるいは、F a s リガンドに対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマからmRNAを採取し、これをもとにcDNAライブラリーを作成する。抗原と反応する抗体を産生しているクローンをスクリーニングし、得られたクローンを培養し、培養混合物から目的とする抗体を公知方法を組み合わせて精製する。

本発明の、結合性フラグメント及びそれらの他の誘導体を含む免疫グロブリンは種々の組み換えDNA技術により製造されることができ、トランスフェクションされた細胞、好ましくは不死化された真核細胞、例えばミエローマ又はハイブリドーマ細胞中で最終的に発現されうる。ヒト化免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一配列、及び所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二配列セットを含むポリヌクレオチドが、合成的に又は適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを組み合わせることによって製造される。

一の態様においては、本発明は、F a s リガンドの所望のエピトープに結合できる免疫グロブリン、好ましくは本発明(1)の抗体、例えばモノクローナル抗体マウスF 9 1 9 - 9 - 1 8からの重鎖及び／又は軽鎖CDRをエンコードする組み換えDNAセグメントに向けられている。これらの領域をエンコードするDNAセグメントは、典型的には、適当なヒトフレームワーク領域をエンコードするDNAセグメントに連結される。好例としてのDNA配列(これらは、発現すると、モノクローナル抗体マウスF 9 1 9 - 9 - 1 8の重鎖及び軽鎖CDR

を含むポリペプチド鎖をコードする)は、図12および13に含まれる。コドン縮重及び重要でないアミノ酸置換のため、以下に詳述する如く、他のDNA配列が容易にそれらの配列の代わりに用いられうる。ヒト化免疫グロブリンのデザイン及び製造の詳細な記載のためには、国際特許出願公開公報WO/07861が参照される。

DNAセグメントは、典型的には、更に、ヒト化免疫グロブリンコーディング配列に作動可能に連結された発現制御DNA配列を含み、自然に随伴されている又は異種のプロモーター領域を含む。好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換又はトランスフェクションできるベクター中の真核生物のプロモーター系であるが、原核生物宿主のための制御配列もまた用いられ得る。ベクターがいったん適当な宿主中に組み入れられると、宿主はヌクレオチド配列の高レベルでの発現に適した条件下で維持され、そして所望により、軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖ダイマー又は完全な抗体、結合フラグメント又は他の免疫グロブリン形態の収集及び精製が引き続き行われうる。

所望のヒト化抗体を最終的に発現できる本発明の核酸配列は、種々の異なったポリヌクレオチド(ゲノムDNA又はcDNA、RNA、合成オリゴヌクレオチド等)及び構成成分(例えば、V、J、D及びC領域)から、並びに種々の異なった技術により形成されうる。適当なゲノム配列と合成配列を連結することは、現在、製造の最も普通の方法であるが、cDNA配列もまた利用されうる(ヨーロッパ特許第0239400号公報及びリーチマン、L.ら、ネイチャー332:323-327(1988)、これらの引例は共に、本明細書の一部と成す、参照)。

ヒト定常領域DNA配列は、良く知られた方法に従って、種々のヒト細胞、好ましくは不死化されたB細胞から単離されうる（カバット、前掲、及びWO 87/02671 参照）。本発明の免疫グロブリンを製造するためのCDRは、同様に、Fasリガンドに結合できるモノクローナル抗体から由来し、そしていずれかの便利な哺乳動物源（マウス、ラット、ウサギ又は良く知られた方法によって抗体を生産できる他の脊椎動物を含む）中で生産される。DNA配列のための適したソース細胞、及び免疫グロブリン発現及び分泌のための適した宿主細胞は、多くのソース、例えばアメリカン タイプ カルチャー コレクション（セルライン及びハイブリドーマのカatalog、第5版（1985）、ロックビル、MD、）から得ることができる。好ましい実施態様において、CDRは、それぞれ、マウスF919-9-18のCDR配列に対応する配列を有し、そしてマウスF919-9-18の対応するCDRアミノ酸配列がコードされる同義性のヌクレオチド配列を含みうる。

本明細書に詳細に記したヒト化免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同な」修飾された免疫グロブリンが、本技術分野の熟練者に良く知られた種々の組み換えDNA技術を利用して容易にデザインされそして製造されうる。例えば、種々の異なるヒトフレームワーク領域が、本発明のヒト化免疫グロブリンのための基礎として、単独でまたは組み合わせて使用することができる。さらに、フレームワーク領域は、いくつかのアミノ酸の置換、末端及び中間での付加や欠失等によって、その1次構造レベルにて天然の配列から変化させることができる。もちろん、フレームワーク中のアミノ酸の多くは、抗体の特異性又は親和性に対しては、殆ど或いは全く、直接には寄与しない。従って、フレームワーク

アミノ酸残基の多くの個々の同類置換は、得られたヒト化免疫グロブリンの特異性又は親和性を感知できるほど変えることなしに許容され得る。しかしながら、一般的にこのような置換は望ましくない。遺伝子の修飾は、種々の良く知られた技術、例えば、特定部位の突然変異誘発（ギルマン アンド スミス、Gene 8 : 81-97 (1979) 及びロバーツら、ネーチャー 328 : 731-734 (1987) 参照）によって、容易に達成されうる。

或いは、一次の抗体構造の部分のみを含むポリペプチドフラグメントを製造することができ、該フラグメントは1又はそれ以上の免疫グロブリン活性（例えば、結合活性）を有する。これらのポリペプチドフラグメントは、本技術分野にて良く知られた方法によって完全な抗体を蛋白質分解することにより、又は、特定部位の突然変異誘発を用いて停止コドンベクター pV<sub>k</sub> 及び pV<sub>g1-dhfr</sub> の所望の位置、例えば F<sub>a</sub>b フラグメントを製造するために C<sub>H</sub>1 の後に、又は F<sub>(a b')</sub> 2 フラグメントを製造するために ヒンジ領域の後に挿入することにより製造されうる。一本鎖抗体は、DNA リンカーを用いて V<sub>L</sub> 及び V<sub>H</sub> を連結することにより製造されうる（ヒューストンら、前掲、及びバードら、前掲、参照）。一つの例として、F<sub>v</sub> 又は F<sub>a</sub>b フラグメントが、ブフナー アンド ルドルフ（Bio/Technology 9 : 157-162 (1991)）及びスケラら（Bio/Technology 9 : 273-277 (1991)）の方法（これらの引例をもって本明細書の一部と成す）に従って、E. coli 中で製造されうる。F<sub>v</sub> 及び F<sub>a</sub>b はまた、真核生物細胞、好ましくは哺乳動物細胞中で、コードしているポリヌクレオチドを発現することにより製造されうる。また、多くの遺伝子と同様に、免疫グロブリン関連

遺伝子は分離された機能的領域を含み、それぞれが1以上の別個の生物学的活性を有しているので、遺伝子は、新規な性質を有している融合蛋白質（例えば、イムノトキシン）を製造するために、他の遺伝子からの機能的領域（例えば、酵素、共通の譲渡人を有する米国特許シリアル番号第132,387号明細書（1987年12月15日出願）、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照）に融合されうる。

バクテリア宿主中でのヒト化免疫グロブリン配列の発現は、CDR領域を突然変異誘発し、かつFasリガンドに対する高い親和性及び／又は高い特異的結合性を有するヒト化免疫グロブリンCDR変異型のためにスクリーニングされることのできるバクテリオファージ表現 (display) ライブラリーを製造することにより、より高い親和性のヒト化免疫グロブリン配列を選択するために有利に用いられ得る。このような鋭敏な親和性の潜在的な利点は、Fasリガンド以外の分子との結合親和性が改善された及び／又は交叉反応が減少されたヒト化免疫グロブリンCDR変異型の製造である。免疫グロブリン可変領域配列を有するファージディスプレイライブラリーを製造するための方法は、本技術分野において提供されており、例えば、セサリーニ、FEBS Lett 307:66-70 (1992) ; スイマーら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3756-60 (1992) ; グラムら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-80 (1992) ; クラックソンら、ネイチャー 352:624-8 (1991) ; スコット アンド スミス、サイエンス 249:386-90 (1990)、ガラードら、Bio/Techiques 9:1373-1377 (1991) (これらの引例を

もって本明細書の一部と成す)が参照される。得られた親和性が鋭敏化されたCDR変異型ヒト化免疫グロブリン配列は、次いで、効率的な発現に適した宿主中で発現される。

既に記したように、DNA配列は、配列を発現制御配列に作動可能に連結(即ち、発現制御配列が機能することを保証するように配置)した後に、宿主中で発現される。これらの発現ベクターは、典型的には、エピソードとして或いは宿主染色体DNAの肝要な部分として宿主中で複製可能である。通常、発現ベクターは、選択マーカー、例えばテトラサイクリン耐性(tetR)、G418耐性(neoR)、ミコフェノール酸耐性(gpt)又はHSV-tkを含み、所望のDNA配列で形質転換された細胞の検出を可能とする(例えば、米国特許第4,704,362号明細書、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照)。

E. coliは、本発明のDNA配列をクローニングするために特に有用な一つの原核生物宿主である。使用に適した他の微生物宿主は、バチルス、例えば枯草菌、及び他の腸内細菌科、例えばサルモネラ、セラチア、及び種々のシェードモナス種を含む。これらの原核生物宿主において、また発現ベクターを作ることでもでき、該ベクターは、典型的には、宿主細胞と適合した発現制御配列(例えば、複製起点)を含む。更に、任意の数の種々の良く知られたプロモーター、例えば、ラクトースプロモーター系、トリプトファン(trp)プロモーター系、 $\beta$ -ラクタマーゼプロモーター系、又は $\lambda$ ファージからのプロモーター系が存在してもよい。プロモーターは、典型的には(場合によりオペレーター配列と共に)発現を調節し、そして、転写及び翻訳を開始し、完成させるためのリ

ボソーム結合部位配列等を有する。

他の微生物、例えば酵母もまた発現のために用いられ得る。サッカロミセスは、発現制御配列、例えば、3-ホスホグリセレートキナーゼ又は他の解糖酵素を含むプロモーター、及び複製起点、末端配列、及び所望の類似のものを有する適当なベクターを伴った好ましい宿主である。

植物又は植物細胞培養物が、本発明のヒト化免疫グロブリンの発現のために用いられ得る (ラリック アンド フライ、Hum. Antibodies Hybridomas 2 (4) : 172-89 (1991) ; ベンヴェヌトラ、Plant Mol. Biol. 17 (4) : 865-74 (1991) ; デューリンら、Plant Mol. Biol. 15 (2) : 281-93 (1990) ; ハイアットら、ネーチャー 342 : 76-8 (1989) 、これらの引例をもって本明細書の一部と成す)。好ましい植物宿主は、例えば、アラビドプシス (Arabidopsis)、ニコチアナ タバカム (Nicotiana tabacum)、ニコチアナ ルスチカ (Nicotiana rustica) 及びソラヌム ツベロズム (Solanum tuberosum) を含む。本発明のヒト化抗 Fas リガンド抗体がコードされるポリヌクレオチド配列を発現するための好ましい発現カセットは、その中で、ヒト化免疫グロブリン鎖をエンコードする挿入されたポリヌクレオチド配列が重複したエンハンサーとともに CaMV 35S プロモーターに作動可能に連結されているところのプラスミド pMOG18 である。pMOG18 は、シーモンズら、Bio/Technology 8 : 217-221 (1990) (この引例をもって本明細書の一部と成す) の方法に従って用いら

れる。或いは、植物中でのヒト化免疫グロブリンの発現のための好ましい実施態様は、ハイアットらの方法（前掲）に従う。但し、本発明のヒト化抗F a s リガンド抗体がコードされるポリヌクレオチド配列を、ハイアットら（前掲）によって用いられた免疫グロブリン配列に代えて用いる。アグロバクテリウム ツミファシエンスのT-DNAに基づいたベクターもまた、ヒト化免疫グロブリン配列を発現するために用いられることができ、好ましくは、このようなベクターは、スペクチノマイシン耐性又は他の選択性マーカーがコードされるマーカー遺伝子を含む。

昆虫細胞培養物もまた、本発明のヒト化免疫グロブリンを製造するために用いられることができ、代表的には、バキュロウイルスに基づいた発現系が用いられる。ヒト化免疫グロブリンは、プトリッツら、Bio/Technology 8 : 6 5 1 - 6 5 4 ( 1 9 9 0 ) の方法（本引例をもって本明細書の一部と成す）に従って、ヒト化免疫グロブリンがコードされるポリヌクレオチド配列を発現することにより製造されうる。プトリッツらの方法に、本発明のヒト化抗F a s リガンド抗体をエンコードするポリヌクレオチド配列をプトリッツらのマウスモノクローナルA b 6 A 4 重鎖及び軽鎖c DNA配列の代わりに挿入するという変更を加えることができる。

微生物及び植物に加えて、哺乳動物細胞培養物もまた、本発明のポリペプチドを発現し、製造するために用いられ得る〔ウイナッカー、遺伝子からクローンへ（VCH パブリッシャーズ、N. Y. 、1987）、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照〕。哺乳動物細胞は、実際に好ましい。なぜなら、完全な免疫グロブリンを分泌できる多くの適した宿主セルラインが本技術分野で開発され



ており、それらは、CHOセルライン、種々のCOSセルライン、HeLa細胞、好ましくはミエローマセルライン等、又は形質転換されたB細胞又はハイブリドーマを含む。これらの細胞の発現ベクターは、発現制御配列、例えば、複製起点、プロモーター、エンハンサー（クイーンら、Immunol. Rev. 89:49-68 (1986)、本引例をもって本明細書の一部と成す）、及び必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアデニル化部位、及び転写ターミネーター配列を含む。好ましい発現制御配列は、免疫グロブリン遺伝子、SV40、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス、サイトメガロウイルス等から由来のプロモーターである。一般に、選択性マーカー、例えばneoR発現カセットは、発現ベクター中に含まれる。

本発明のヒト化免疫グロブリンがコードされるトランスジーンは、所望のヒト化免疫グロブリンを、典型的には、回収可能な体液、例えばミルク又は血清中に発現するトランスジェニック非ヒト動物を製造するために用いられ得る。このようなトランスジーンは、通常は連結されたエンハンサー、例えば齧歯類の免疫グロブリンエンハンサー又はカゼイン遺伝子プロモーター／エンハンサー（ブーラーら、Bio/Technology 8:140-143 (1990)；メアデら、Bio/Technology 8:443-446 (1990)、これらの引例をもって本明細書の一部と成す）と共に、プロモーターに作動可能に連結されたヒト化免疫グロブリンがコードされるポリヌクレオチド配列を含む。トランスジーンは、本技術分野で示されそして以下に記載された方法に従って、相同な組み換え構築物のために細胞及び胚中に移入されうる。

好ましい非ヒト動物は、マウス、ラット、ヒツジ、ウシ及びヤギを含み、ウシミルク中での発現が特に好ましい（WO 91/08216（1991）、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照）。ヒト化抗体の精製は、免疫グロブリン精製のための本技術分野で公知の精製方法により達成される。目的のDNAセグメント（例えば、重鎖及び軽鎖がコードされる配列及び発現制御配列）を含むベクターは、宿主細胞のタイプに応じて変更を加えた良く知られた方法により宿主細胞中に移入されうる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションは、通常、原核生物細胞のために利用され、一方、リン酸カルシウム処理、リポフェクション、バイオリスティックス（*biolistics*）、ウイルスに基づいたトランスダクション、又はエレクトロポレーションが他の細胞宿主のために用いられ得る。タンゲステン粒子バリスティックトランスジェネシスは、植物細胞及び組織のために好ましい〔一般に、マニアティスら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*（コールド スプリング ハーバー プレス、1982）、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照〕。

いったん発現されれば、本発明の、完全な抗体、それらのダイマー、個々の軽鎖及び重鎖、または免疫グロブリンの他の形態は、本技術分野の標準方法に従って精製されることができ、該方法は、硫酸沈殿、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む〔一般に、スコープス、R.、蛋白質精製（スプリンガーフェルラーク、N. Y.、1982）、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照〕。薬学的用途のためには、少なくとも約90～95%の均質性の実質上純粋な免疫グロブリンが好ましく、98～99%

或いはそれ以上の均質性が最も好ましい。いったん部分的に又は所望の均質性まで精製されると、その後、ポリペプチドは、治療用に（体外用途を含む）、又は検定方法、例えば免疫蛍光染色等の開発及び実行において用いられ得る。一般に、免疫学的方法、第I及びII巻（ルフコビッツ アンド ペルニス編、アカデミック プレス、NY、1979及び1981）を参照することができる。

本発明の他の一つの態様において、モニター上に抗体の3次元イメージを示すコンピュータプログラムが提供される。例えば、UNIXオペレーティングシステム下で動き、分子モデリングパッケージQUANTA（Polygen Corp. USA）を用いるシリコングラフィックスIRIS 4Dワークステーションが適している。コンピュータは、ヒト化抗体の変異体を作るのに有用である。一般に、本発明の抗体は既に、満足のいく結合親和性を提供している。しかしながら、なお強い結合親和性をもった抗体を、あるアミノ酸残基の更なる変更により同定できると見込まれる。3次元イメージはまた多くの重要なアミノ酸を同定し、該アミノ酸は、抗体の結合親和性に検出されるほど影響しない同類置換の対象となりうる。全体的に、同類置換でさえ免疫グロブリンの特性に著しく影響するかもしれない。しかしながら、多くの個々の同類置換は、免疫グロブリンの特性を著しく損なうことはないようである。

本発明の他の一つの態様において、Fasリガンドに対するヒト抗体が提供される。これらの抗体は、下記する種々の技術により製造される。例えば、インビトロ免疫化法、トリオーマ方法論（オストベルグら、Hybridoma 2: 361-367 (1983)；オストベルグ、米国特許第4,634,664号明細書；及びエンゲルマンら、米国特許第4,634,666号）、およびヒト抗

体遺伝子トランスジェニック非ヒト動物 [ロンベルグら、WO 93/12227 (1993) ; クッヘルラパティエ、WO 91/10741 (1991)]、などが応用でき、これらと慣用のケーラー-ミルステイン法を組み合わせるによりヒトモノクローナル抗体が調製される。

また、ヒュースら、サイエンス、246:1275-1281 (1989) によって概説されている通常のプロトコルに従ってヒトB細胞からのDNAライブラリーをスクリーニングすることである。Fasリガンド又はそのフラグメントに結合する抗体が選択される。次いで、このような抗体 (又は結合性フラグメント) がコードされる配列がクローン化され、増幅される。ヒュースによって記載されたプロトコルは、ファージ表現技術と組み合わせると更に効率的に変わる。例えば、ドワーら、WO 91/17271 及びマッカフェルティら、WO 92/01047 (これらの引例をもって、それぞれ本明細書の一部と成す) が参照される。これらの方法において、メンバーが、それらの外表面上に種々の抗体を発現するところのファージライブラリーが製造される。抗体は、通常、Fv又はFabフラグメントとして表現される。所望の特異性を有する抗体を発現するファージは、Fasリガンドポリペプチド又はそのフラグメントに対する親和性の増大により選択される。

ファージ表現法の変法において、選択されたネズミ抗体の結合特異性を有するヒト抗体が製造されうる (ウインター、WO 92/20791 参照)。

本発明の抗Fasリガンド抗体は、体液中や組織中に存在するFasリガンドを検出するために使用することができる。また、Fasリガンドを精製するために使用する抗体カラムの作製、精製時の各分画中のFasリガンドを検出するた

めに使用することができる。

本発明の抗F a s リガンド抗体には細胞に対するF a s リガンドの作用を修飾、例えば促進または抑制するものが含まれる。

F a s リガンドが誘導するアポトーシスを抑制する効果を有する抗体を得るには、前記ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を製造する過程で得られる血清や、ハイブリドーマの培養上清を、F a s リガンドもしくはF a s リガンドを発現する細胞と、F a s 抗原を発現する細胞とを使用したin vitroのアッセイ系等にかけてスクリーニングする。スクリーニングの結果、選別された血清や培養上清から公知方法を組み合わせて目的の抗体を精製する。なお、F a s リガンドもしくはF a s リガンドを発現する細胞とF a s 抗原を発現する細胞を利用したスクリーニング方法の好ましい例は、実施例で例示されるが、国際特許出願公開WO 95 / 1 3 2 9 3 等にも詳述されている。また、特定のF a s リガンド、例えば実施例で示されているnd 3 2、nd 4 2またはL 1 7 9 Fの少なくとも1つとの反応性、およびnd 4 2またはcd 1 7 9の少なくとも1つとの非反応性を指標としてスクリーニングすることも可能である。

本発明の抗体又はそれらの混液を含む組成物は、予防的な及び／又は治療的な処置のために投与されうる。特に、F a s リガンドが誘導するアポトーシスを、高度に抑制することができる本発明の中和抗体は、生体におけるアポトーシスを調節するために使用することができる。たとえば、当該抗体はリウマチにおける関節組織の破壊、全身性エリテマトーデス（S L E）における自己組織の破壊、あるいは糖尿病、インフルエンザ、エイズ、肝炎等の組織や細胞のアポトーシス

が関与する疾患の治療薬として使用することができる。

一方、本発明の抗体の中でF a s リガンドの作用を促進する抗体は、エイズ感染初期の治療や、リウマチにおける滑膜細胞の異常増殖や自己免疫疾患における自己抗原反応性T細胞の増殖を抑制するため等、生体にとって不要な細胞を除去するために使用できる。

本発明の抗体及びそれらの薬学的組成物は、特に、非経口投与、即ち、皮下、筋肉内又は静脈内投与において有用である。本発明の抗体はまた、典型的には局所適用のために、胃瘻栄養法又は（胃）洗浄、腹腔内注入、眼軟膏剤、局所軟膏剤、頭蓋内注入（典型的には、脳室中に）、心膜内注入、又は内包（i n t r a b u r s a l）注入によって投与されうる。非経口投与のための組成物は、通常、許容される担体、好ましくは水性担体中に溶解された免疫グロブリンの溶液又はその混液を含む。種々の水性担体、例えば、水、緩衝水、リン酸塩緩衝生理食塩水（P B S）、0.4%生理食塩水、0.3%グリシン、ヒトアルブミン溶液等が用いられ得る。これらの溶液は、無菌であり、そして一般的には微粒子物質が存在しない。これらの組成物は、慣用の、良く知られた滅菌方法により滅菌されうる。組成物は、生理学的条件に近づけるために、要求に応じて、薬学的に許容できる補助物質、例えばp H調節及び緩衝化剤、毒性調節剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム及び乳酸ナトリウムを含みうる。これらの製剤中の抗体の濃度は、広範囲に、即ち、約0.005重量%未満（通常は、少なくとも約1重量%）から15又は20重量%と大きい量まで変化することができ、主として、選択された投与の特定の様式に従って、液容量、粘性等に基づいて選択される。

非経口投与組成物を調製するための現実の方法は、本技術分野の熟練者にとって公知又は明白であり、例えば、レミントンズ ファーマシューティカル サイエンス（第15版、マック パブリッシング カンパニー、イーストン、ペンシルバニア、1980）（本引例をもって本明細書の一部と成す）に更に詳細に記載されている。洗浄（lavage）又はその他のルートのために適した組成物は、意図される特定の使用に従って選択される。いくつかの薬学的組成物は、抗 Fas リガンド抗体及びその疾患に於いて常用される他の治療剤を含みうる。いずれの場合も、ボラス投与および持続投与が適用されうる。また、予防的または治療的有效量は、対象疾患、病態および患者の状態等によって適宜決定される。

本発明の抗体は、貯蔵のため凍結又は凍結乾燥され、使用に先だって適当な担体中で再構成されうる。この技術は、慣例の免疫グロブリンにおいて有効であると知られており、公知の、凍結乾燥及び再構成技術が用いられ得る。凍結乾燥及び再構成が、様々な程度の抗体の活性損失をもたらしうる（例えば、慣例の免疫グロブリン、IgM抗体は、IgG抗体よりも大きい活性損失を生じる傾向にある）ということ、及び使用レベルが、それを補うために調節されなければならないかもしれないということは、当業者にとって認識されることである。

本発明の好ましい薬学的組成物は、Fas リガンド発現細胞へ特定の薬剤等を送達するためのデリバリーシステムとしての、特に、Fas リガンド発現細胞を殺すための、イムノトキシン中での本発明の主体である免疫グロブリンの使用を含む。イムノトキシンは、2つの構成成分によって特徴づけられ、特に、インビトロ又はインビボで選択された細胞を殺すのに有用である。一つの構成成分は、

細胞障害剤であり、それは、通常、付着された又は吸収されたときに細胞に対して致死である。第二の構成成分は、「デリバリービヒクル」として知られており、特定の細胞タイプ、例えば Fas リガンドエピトープを発現している細胞に、毒性の薬剤をデリバリーする手段を提供する。2つの構成成分は、通常、種々の良く知られた化学的方法のいずれかにより、互いに化学的に結合されている。例えば、細胞障害剤が蛋白質でありかつ第二の構成成分が完全な免疫グロブリンである場合は、結合は、ヘテロ二価性の架橋物質、例えば、SPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等である。種々のイムノトキシンの製造は、本技術分野で良く知られており、例えば、「モノクローナル抗体-毒素コンジュゲート：不思議な弾丸を狙って」トルペら、*Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine*, アカデミック プレス、第168-190頁(1982) (本引例をもって本明細書の一部と成す) 中に見ることができる。構成成分はまた、遺伝子的に連結される [チャウダリーら、*ネーチャー* 339: 394 (1989)、本引例をもって本明細書の一部と成す、参照]。

種々の細胞障害剤が、イムノトキシンの使用に適している。細胞障害剤は、放射性核種、例えば、ヨウ素-131 或いは他のヨウ素のアイソトープ、イットリウム-90、レニウム-188 及びビスマス-212 或いは他の  $\alpha$  エミッター、多くの化学療法剤、例えば、ビンデシン、メソトレキセート、アドリアマイシン及びシスプラチン、及び細胞障害蛋白質、例えば、リボソーム阻害蛋白質様ポークウィード抗ウイルス蛋白質、シュードモナスエキソトキシンA、リシン、ジフテリア毒素、リシンA鎖等、又は細胞表面で活性な薬剤、例えばホス



ホリパーゼ酵素（例えば、ホスホリパーセC）を含みうる〔一般に、共通の譲渡人を有する米国特許出願シリアル番号07/290,968および07/310,252号明細書、「キメラ毒素」オルスネス アンド フィル、Pharmac. Ther.、25:355-381（1982）、及び癌の検出及び治療のためのモノクローナル抗体（バルドウィンとバイエルズ編、アカデミック プレス、1985）、159-179頁、224-226頁、これら全ての引例をもって本明細書の一部と成す、参照〕。

イムノトキシン中のデリバリー成分は、本発明の免疫グロブリンを含む。完全な免疫グロブリン又はそれらの結合性フラグメント、例えば、Fab又はFvが好ましく用いられる。典型的には、イムノトキシン中の抗体は、ヒトIgM又はIgGイソタイプであるが、他の哺乳動物定常領域が、所望により用いられ得る。

Fasリガンド自体を、治療や研究に使用するためには、当該蛋白質を高純度で、大量に生産することが必要になるが、本発明の抗Fasリガンド抗体はFasリガンドの精製に有用である。特に本発明の中和抗体は生物活性を有するFasリガンドと選択的に結合するため治療用の医薬として重要な、活性を保持したFasリガンドを高純度にかつ効率よく精製することができる。

本発明の測定方法は、上記のようにして得た抗体を用いるステップを含むが、該ステップは、対象試料中の被検物質であるFasリガンドと、上記のようにして得た抗体との抗原抗体反応による、対象試料中の被検物質をトラップする工程であることが好ましい。

本発明の測定方法における被検物質の検出原理は特に限定されないが、凝

集法、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法等が例示される。この内、サンドイッチ法及び競合法が好ましく、特にサンドイッチ法が好ましい。

凝集法では、抗体を粒子、例えばラテックス粒子や赤血球（例えば羊赤血球）の表面に結合させて、F a s リガンドが存在すると粒子の凝集が生じるようにし、この粒子の凝集の程度を指標としてF a s リガンドを測定する。

なお、この凝集法では、ラテックスや赤血球以外にも、ゼラチンやマイクロビーズ、カーボン粒子等、一般に用いられている粒子を使用することができる。

また、サンドイッチ法、固相直接法または固相結合法、競合法では、標識された抗体や抗原を使用し、エンザイムイムノアッセイ（E I A）、ラジオイムノアッセイ（R I A）、ケミルミネッセンスイムノアッセイ（化学発光免疫測定法）、フルオロイムノアッセイ（蛍光免疫測定法）、時間分解蛍光免疫測定法（T R - F I A）、イムノクロマトグラフィーアッセイ（I C A）等の原理で測定を行なうことができる。

以下に、本発明の測定方法の好適例の1つである、E I Aの原理に基づく、サンドイッチ法、固相直接法、競合法を説明する。

E I Aによるサンドイッチ法では、まず、ペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ等の酵素で標識した、F a s リガンドを認識する抗体または2次抗体を準備する。特にポリペルオキシダーゼ標識した抗体は好ましい例である。また、使用する固相には、F a s リガンドを認識する抗体を吸着させておく。サンプル（試料）もしくはスタンダードを添加後、上述の酵素

標識抗体を添加し、抗原抗体反応を行なわしめる。過剰の酵素標識抗体を洗浄操作で除去した後、使用する酵素に応じた発色基質、例えばオルトフェニレンジアミンと $H_2O_2$ 、p-ニトロフェニルリン酸、2-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド等を加えて酵素と反応させる。基質の発色は、酵素量、ひいてはサンプル中のFasリガンドに依存するので、発色最終産物の量を測定することによりFasリガンドを定量することができる。

固相直接法では、サンプル（試料）を直接固相に吸着させ、固相のFasリガンド非吸着面を、その測定系には影響しないタンパク質、例えばBSA（ウシ血清アルブミン）などでブロッキング処理し、次いでFasリガンドを認識する酵素標識抗体を添加し、反応させる。以降は、サンドイッチ法と同様の操作を行ない、サンプル中のFasリガンドの有無を判定するか定量を行う。

競合法では、使用する抗体が認識する一定量のFasリガンドを直接固相に吸着させ、次いでブロッキング処理した後、ここに、Fasリガンドを認識する酵素標識抗体とサンプル（試料）とを添加する。一定時間反応させた後、洗浄して固相に非結合の物質を除去し、発色基質を加えて酵素と反応させる。反応後、サンプル添加による、酵素標識抗体の固相Fasリガンドへの結合阻害度を測定することにより、サンプル中のFasリガンドを定量する。

なお、はじめに抗体を固相に吸着させ、酵素標識したFasリガンドをサンプルと同時に添加し、サンプル添加による標識物の固相化抗体への結合阻害度を測定することにより、サンプル中のFasリガンドを定量してもよい。

上記以外の方法として、抗原抗体反応を液相中で行ない、後に、抗体を用いた凝集沈降法もしくは物理化学的な手法によって、標識抗体と結合したFas

リガンドと結合しなかったF a s リガンドを分離し定量する方法もある。また、F a s リガンドを認識する抗体を標識するのではなく、その抗体を認識する二次抗体を得、それを標識し、抗原抗体反応を行なわせて、F a s リガンドを測定することも可能である。

サンドイッチ法、固相直接法、競合法のいずれにおいても、標識酵素－発色基質の組合せを、標識酵素－生物発光基質または化学発光基質、標識酵素－蛍光基質等の組合せに変えることが可能である。この場合の、酵素－発光基質の代表的な組合せは、アルカリフォスファターゼ－AMP PD、ホースラディッシュペルオキシダーゼ－ルミノール、ルシフェラーゼ－ルシフェリン等があり、酵素－蛍光基質の代表的な組合せは、アルカリフォスファターゼ－ウンベリフェリルフォスフェート、ホースラディッシュペルオキシダーゼ－p－ヒドロキシフェニルプロピオン酸等がある。

さらに、上記3種の測定方法において、酵素に代わって、放射性物質や化学発光物質あるいは蛍光物質で直接あるいは間接的に標識された抗体や抗原を用い、放射能や発光、蛍光の強度を測定することにより、サンプル中のF a s リガンドを測定することも可能である。

放射性物質としては、 $^{125}\text{I}$ や $^{131}\text{I}$ 等が一般に使用されており、化学発光物質の代表的な物には、アクリジニウムエステル等がある。また、蛍光強度を測定する場合には、より高感度な方法として、抗体あるいは抗原にキレート剤を直接あるいは間接的に結合させ、励起光照射後にそのキレート剤に結合する希土類金属から発せられる蛍光の強度を時間分解的に測定することにより、試料中のF a s リガンドを測定する方法（時間分解蛍光免疫測定法）も有用である。なお、代表

的な希土類金属の例として、ユーロピウムがあげられる。

本発明の測定方法は、以上説明したように、試料中のF a s リガンドを検出または測定することを目的としている。この場合、対象試料は動物、特にヒトの体液あるいは、組織、細胞および菌体ならびにそれらの抽出液、培養上清、塗末標本および切片があげられるが、体液であることが好ましい。より好ましくは、血液、血漿、血清、尿、髄液、リンパ液、唾液、腹水、胸水より選ばれる試料である。

本発明の測定方法を用いて健常人及び種々の疾患を有する患者の体液中のF a s リガンドを測定することができる。また、初めて体液中のF a s リガンド濃度が明らかとなり、特定の疾患においてF a s リガンド濃度が変動することも明らかとなった。

なお、本発明の測定試薬及びキットは、上記した測定方法の構成等に準拠することができる。

## 実施例

以下に、実施例をもって本発明を一層具体的に説明するが、これらは一例として示すものであり、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

また、以下の記載において用いる略号は、当該分野における慣用略号に基づくものである。

なお、以下に示す実施例中の諸操作は、主にサンプブルック等編〔モレキュラークローニング、ア ラボラトリーマニュアル 第2版〕コールドスプリングハーバーラボラトリー、1989年；今本文男等編〔組換え遺伝子の細胞への導入と発現〕蛋白質核酸酵素臨時増刊28（14）1983年；岡田善雄監修〔細胞工学的技術総集編〕実験医学臨時増刊7（13）1989年等を参考として実施した。

### 1. 抗F a s リガンドペプチド抗体の作製

#### 1-1 抗原ペプチドの選択

図1に示すように、配列表の配列番号9のF a s リガンド細胞外領域中に想定しうるエピトープの解析を行った。F a s リガンド細胞外領域のアミノ酸配列と相同性が高いタンパク質を、生体高分子立体構造のデータベースであるP R O T E I N D A T A B A N K (PDB) から、B I O S Y M社製、H o m o l o g yモジュール中のF A S T Aプログラムによって検索した。その結果、T N F -  $\alpha$  (PDB-1 D 1 T N Fおよび2 T U N) が、全体構造的に相同性の高いことが判明した。そこで、これらのT N F -  $\alpha$  立体構造を参照タンパク質として、F a s リガンド細胞外領域のモデリングを行った。モデル構造構築において基盤構造とする構造保存領域の抽出は、T N F -  $\alpha$  各単量体構造を $\alpha$ 炭素

によって重ね合わせ、構造上のずれが1オングストローム以内であり、かつX線結晶解析において温度因子が20以下となるような領域に設定した。構造保存領域に結合させる可変領域は、挿入欠失のある場合に限り、PDB中の適当な構造を検索した。構造の構築には、BIOSYM社製、Homologyモジュールを使用した。構築した初期構造の置換の入った側鎖に関して、その配座のグローバルミニマムサーチを行った後、BIOSYM社製の計算ソフトウェアDiscoverを用いて構造最適化計算をかけFasリガンド細胞外領域モデル構造を得た。得られたモデル構造を用いて分子表面に露出している構造領域、TNF- $\alpha$ 各単量体構造の重ね合わせにおいて構造のずれが大きい領域、TNF- $\alpha$ の温度因子が大きい領域を抗体に認識されやすいエピトープを含む領域として選択した。次に、モデル構造の二次構造情報などから、それらの領域のペプチドを合成した際にそのペプチドが抗原構造を維持しやすいように考慮して配列表の配列番号1～8のペプチド8種類のアミノ酸配列を選択した。図1に、選択した8種類のペプチドのアミノ酸配列を示した。合成ペプチドは、キャリアーと結合させるためペプチドのC末端にSH基を持つシステインを導入した。配列表の配列番号1～8の配列は、このシステインを持たない配列で表している。

#### 1-2 抗血清の作製

図1記載のペプチドのアミノ酸配列に基づき、配列表の配列番号1～8のペプチドを株式会社不二家バイオサイエンス研究所に依頼して合成した。ここで、図1に示すように配列番号1～8のアミノ酸配列に対応するペプチド番号をM52～M59として、以下この記載を用いる。また、キャリアーとしてのキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)へのマレイミド法による結合およびウサギへ

の免疫は株式会社免疫生物研究所に依頼した。

### 1 - 3 抗血清の評価

投与したペプチドに対する抗体価の上昇は株式会社免疫生物研究所において、固相化したペプチドと抗血清との反応性を測定することにより確認した。その結果、投与した8種類のペプチドに対する各々の抗血清は約6000倍～24000倍の希釈倍率で固相化した対応するペプチドと反応した。

次に、ヒトFasリガンドに対して結合するか否かを確認するため、ウェスタンブロッティングを行った。後述する4-1に記載のFasリガンド細胞外領域を含む培養上清10 $\mu$ lをゲルローディングバッファー (SEPRASOL、Integrated Separation Systems社) と等量混合し37℃で1時間処理した。この溶液2 $\mu$ lを4～20%のSDS-PAGE (テフコ社) の各ウェルにアプライし、25mAにて室温で約1時間泳動した。泳動終了後、PDVFメンブレン (ミリポア社) に4℃にて200mA、90分の条件で転写した。メンブレンを原液のブロッキング剤 (ブロックエース、雪印乳業 (株)) で室温1時間振とうしブロッキングを行ったのち、各レーンを裁断した。各レーンを0.5%BSAを添加した0.05%Tween20を含む0.076M PBS (pH6.4) (以下、T-PBSと略す) で各々500倍に希釈した各抗血清1mlに浸し、室温にて1時間振とうした。反応終了後、各レーンをT-PBSで2回洗浄し、次に10%ヤギ血清を添加したT-PBSで500倍に希釈したHRPO標識抗ウサギIgG抗体 (ダコ社) 1mlに浸し、室温にて1時間反応させた。T-PBSで5回洗浄後、ECLシステム (アマーシャム社) で検出した。また、プレートに結合したFasリガンド細胞



外領域との反応性をプレートアッセイ（固相直接法）にて確認した。まず、イムノプレート（Maxisorp、Nunc社）に0.076M PBS（pH 6.4）（以下、PBSと記す）で0～25 ng/ウェルに希釈した後述の4-1に記載の部分精製Fasリガンド細胞外領域を50  $\mu$ l分注し、45℃で30分間処理しFasリガンド細胞外領域を結合した。イオン交換水で5回洗浄後0.1%BSA/PBSを100  $\mu$ l/ウェル添加し、ブロッキングした。

（ ）  
ブロッキング剤を除去後、0.1%BSA/PBSで希釈した抗血清を添加し37℃で1時間反応させた。次に0.005%Tween 20を含む0.9%NaClで2回洗浄し、10%ヤギ血清/PBSで1000倍に希釈したHRPO標識抗ウサギIgG抗体（ダコ社）を50  $\mu$ l/ウェル添加し、37℃で1時間反応した。反応終了後、洗浄液で5回、イオン交換水で2回洗浄し、3 mg/ml オルトフェニレンジアミンと0.027%過酸化水素を含む0.1M マッキルベインバッファー（pH 5.0）50  $\mu$ lを添加し5分間反応後、1N塩酸50  $\mu$ lで反応を停止し490 nmの吸光度を測定した。さらに、Fasリガンドによるアポトーシス誘導活性に与える影響について<sup>51</sup>C rリリースアッセイ法を用いて検討した。1.0<sup>6</sup> 個のWC8細胞を20  $\mu$ Ciの（<sup>51</sup>C r）クロム酸ナトリウム（NEN社）を含むRPMI 1640培地を用いて37℃で2時間培養し、<sup>51</sup>C rで標識した。次に<sup>51</sup>C rで標識した細胞を1×10<sup>4</sup> 個含む反応液中に、抗血清を終濃度500倍希釈となるように添加し、さらにCOS-1細胞由来のFasリガンド細胞外領域の培養上清（Fasリガンド細胞外領域濃度約0.9  $\mu$ g/ml相当）を終濃度10%で添加し、37℃で4時間培養後、<sup>51</sup>C rの遊離を指標にアポトーシス誘導活性を測定した。表1は各抗血清

のF a s リガンドに対する結合活性とアポトーシス誘導活性への効果を示している。ウエスタンブロッティングではM 5 2 およびM 5 7 ペプチドを投与し作製した抗血清はF a s リガンド細胞外領域と結合した（+）が、他の抗血清は結合しなかった（-）。一方、プレートアッセイでは各抗ペプチド抗血清のうち、M 5 2 またはM 5 7 ペプチドを投与して得られた抗血清はF a s リガンドと強く（++）反応し、M 5 3 またはM 5 4 ペプチドを投与して得られた抗血清にも反応性（+）が認められた。また、アポトーシス抑制活性はどの抗血清にも認められなかったが、M 5 2 ペプチドを投与した抗血清にはF a s リガンドのアポトーシス誘導活性を促進する効果が認められた。

表 1

ウサギ抗ペプチド抗血清の F a s リガンド細胞外領域との反応性および  
アポトーシス誘導活性への影響

抗 血 清	M52	M53	M54	M55	M56	M57	M59
ウェスタンブロッティ ングの結果	+	-	-	-	-	+	-
プレートアッセイの 結果	++	+	+	-	-	++	-
アポトーシス誘導活性 への影響	促進	-	-	-	-	-	-

#### 1 - 4 抗血清の精製

M 5 2 および M 5 7 ペプチドを投与して得られた抗血清 5 m l を塩析法とイオン交換カラム法により精製した。まず、各血清 5 m l に等量の 0. 1 5 M N a C l を添加した後、攪拌しながら希釈前の血清と等量の飽和硫酸を滴下した。室温で 3 0 分間攪拌し、さらに 3 0 分間静置した。1 0 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心し、得られた沈殿を 0. 0 2 M リン酸バッファ（p H 6. 3）5 m l に溶解後、透析した。遠心して不純物を除去した後、同じ

バッファーで平衡化したDEAEセルロース (DE 52、WHATMAN社) 10 ml を充填したカラムにアプライした。未吸着分画を回収し、さらに50 ml のバッファーで洗浄し、未吸着分画と混合した。得られたIgGを含む溶液をダイアフローPM10メンブレン (アミコン社) を用いて濃縮し、M52およびM57のペプチドを投与して得られたそれぞれの抗血清から精製抗体を得た。タンパク濃度を280 nmの吸光度より算出した。

## 2. 抗M52ペプチドモノクローナル抗体の作製

### 2-1 投与抗原の調製およびマウスの免疫

M52ペプチド1.1 mgを0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) 110  $\mu$ l に溶解し、マレイミド化KLH (ベーリンガーマンハイム社) 1.54 mgを蒸留水154  $\mu$ l で溶解した。両者を混合し、室温にて2時間反応させた後、生理食塩水で平衡化したNickカラム (ファルマシア社) で精製し、投与抗原を得た。

調製した投与抗原70  $\mu$ gを生理食塩水で0.1 ml に希釈し等量のフロイント完全アジュバント (DIFCO社) と混合し、ddYマウス (5週令、雌) の腹腔に投与した。2週間後、同量をフロイント不完全アジュバント (DIFCO社) と混合し同様に投与した。

### 2-2 抗血清の評価

投与1週間後、眼底より採血し、Fasリガンド細胞外領域との結合を確認した。まず、イムノプレート (Maxisorp、Nunc社) に0.076 M PBS (pH 6.4) (以下、PBSと略す) で0~100 ng/ウェルに希釈した後述の4-1に記載の部分精製Fasリガンド細胞外領域を50  $\mu$ l 分

注し、45℃で30分間処理しFasリガンド細胞外領域を結合した。イオン交換水で5回洗浄後0.1%BSA/PBSを100μl/ウェル添加しブロッキングした。ブロッキング剤を除去後、0.1%BSA/PBSで希釈した抗血清を添加し37℃で1時間反応させた。次に0.005%Tween20を含む0.9%NaClで2回洗浄し、10%ウサギ血清/PBSで1000倍に希釈したHRPO標識抗マウスIgG抗体(ダコ社)を50μl/ウェル添加し37℃で1時間反応した。反応終了後、洗浄液で5回、イオン交換水で2回洗浄し、3mg/mlオルトフェニレンジアミンと0.027%過酸化水素を含む0.1Mマッキルベインバッファー(pH5.0)50μlを添加し5分間反応後、1N塩酸50μlで反応を停止し490nmの吸光度を測定した。その結果、M52ペプチドを投与して得られたマウス抗血清はFasリガンド細胞外領域と強い反応性を示した。

### 2-3 モノクローナル抗体の作製

2-1で得られた投与抗原70μgを生理食塩水400μlに希釈し、抗体価の上昇したマウスの尾静脈に投与し、3日後、「単クローン抗体実験操作入門、安東民衛・千葉丈著、講談社サイエンティフィク」記載の方法に従い細胞融合を行った。6日後、培養上清中の抗体を2-2記載の方法によりスクリーニングし、反応性の得られたウェルを「単クローン抗体実験操作入門、安東民衛・千葉丈著、講談社サイエンティフィク」記載の限界希釈法によりクローニングした。クローニング後、再度スクリーニングを行い、Fasリガンドと反応する抗M52ペプチドモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ20クローン(F918シリーズ)を得た。後述のF918-4-5(IgG1/λ)、F918-2

-4 (IgG1/λ)、F918-7-3 (IgG1/κ)、F918-9-4 (IgG1/λ)、F918-17-1 (IgG1/κ)、F918-20-2 (IgG1/λ) および F918-23-1 (IgG1/κ) が F918 シリーズに含まれる。得られたハイブリドーマのサブクラスは IgM/κ 3 クローン、IgG1/κ 6 クローン、IgG1/λ 9 クローン、IgG2b/λ 1 クローン、IgG2b/κ 1 クローンであった。ハイブリドーマを無血清培地 (PHFM-II、Gibco BRL 社) で培養し、培養上清を 60% 飽和硫酸で塩析後、IgG はプロテイン-A カラム (PROSEP-A、BIOPROCESSING 社) で精製し、精製抗体を得た。蛋白濃度は 280 nm の吸光度より算出した。

#### 2-4 抗体の評価

得られた精製抗体 (抗体濃度 3 μg/ml) 2 ロット (F918-7-3 および F918-9-4) と Fas リガンド細胞外領域との結合を 1-3 記載の方法に準じてウエスタンブロッティングにより確認した。ここでは、後述する 4-1 に記載の精製 Fas リガンド細胞外領域 (図 2 に示すピキア (Pichia) 酵母由来 Fas リガンド細胞外領域)、実施例の 5-1 に記載の COS-1 細胞由来遊離型 Fas リガンドおよび実施例の 3 に記載の COS-1 細胞由来 Fas リガンド細胞外領域を用いた。2 次抗体として HRP O 標識抗マウス IgG 抗体 (ダコ社) を用い、検出には TMB 試薬 (SCYTEK Laboratories) を用いた。図 2 に示すように、F918-9-4 では分子量約 3 万付近に酵母由来の Fas リガンド細胞外領域、COS-1 由来の Fas リガンド細胞外領域および遊離型 Fas リガンドでバンドが検出され

F a s リガンドと結合していることが確認された。一方、F 9 1 8 - 7 - 3 では酵母およびC O S - 1 由来のF a s リガンド細胞外領域にはバンドが検出されたが、遊離型F a s リガンドにはバンドが検出されなかった。次に、F a s リガンドのアポトーシス誘導活性に与える影響を1 - 3 記載の方法に従って検討した。図3に示すようにF 9 1 8 - 9 - 4 はアポトーシス誘導活性を変化させなかったが、F 9 1 8 - 7 - 3 にはアポトーシス誘導促進活性が認められた。これよりM 5 2 ペプチドを投与したモノクローナル抗体中に少なくとも2種類以上の特異性の異なる抗体が存在することが明らかになった。

### 3. 抗F a s リガンド抗体の作製

#### 3 - 1 投与抗原の調製及びマウスの免疫

投与抗原はC O S - 1 細胞に発現させて後述する方法で調製したF a s リガンド細胞外領域を使用した。C O S - 1 細胞由来のF a s リガンド細胞外領域は、国際特許出願公開W O 9 5 / 1 3 2 9 3 の実施例18に記載のプラスミドp M 1 0 7 0 をC O S - 1 細胞へ導入した形質転換体C O S - 1 / p M 1 0 7 0 を用いて作製した。すなわち、8. 1  $\mu$  g のp M 1 0 7 0 を4 0  $\mu$  l の1 0 m M T r i s - H C l (p H 7. 4) / 1 m M エチレンジアミン四酢酸(以下、T E バッファーと略す)溶液に溶解した。これに、0. 2 m g / m l D E A E - デキストランおよび5 0 m M T r i s - H C l (p H 7. 4) 1 m l を含有するD - M E M (日本製薬(株)) 1 1. 3 m l を添加し、DNA - D E A E デキストラン混合液を作製した。

1 5 0 c m<sup>2</sup> のルーフラスコ内でセミコンフルエントまで単層培養したC O S - 1 細胞にDNA - D E A E デキストラン混合液を滴下し、5 % C O<sub>2</sub> 存

在下で37℃にて培養し、形質転換体COS-1/pM1070を得た。4時間後、DNA-DEAEデキストラン混合液を除去し、10%ウシ胎児血清(FBS、アーバインサイエンティフィック社)を含有するD-MEM培地に交換し、さらに48時間培養した。その後、培地をphenol red free D-MEM(FBS, BSA無添加)に交換し、さらに96時間培養した後、培養上清を回収した。

培養上清は1200rpmで5分間遠心して沈殿物を除去し、0.22μmのフィルターでろ過した。次にダイアフローPM10メンブレン(アミコン社)を用いて10倍に濃縮し、2.5ml(22.5μg相当)をPD10カラム(ファルマシア社)を用いてゲルろ過し、ボイドに溶出される分画3.5mlを回収した。回収した分画をセントリコン-10(アミコン社)で400μlに濃縮し、初回投与抗原とした。また、10倍濃縮した培養上清300μlを4-20%調整用SDS-PAGE(2-D、テフコ社)により泳動し、分子量マーカー(プレステインドSDS-PAGEスタンダードLow、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)を参考にして3万付近のゲルを切り出し粉碎し、生理食塩水中で一晩振とうしてFasリガンド細胞外領域を抽出した。抽出液をセントリコン-10(アミコン社)で200μlに濃縮したものを追加および最終投与抗原とした。

マウスの免疫は、まず初回投与用抗原200μlを等量のプロイント完全アジュバント(DIFCO社)と混合し、ddYマウス(5週令、雌)の腹腔に投与した。2週間後、追加投与用抗原100μlを等量のプロイント不完全アジュバント(DIFCO社)と混合し同様に投与した。



### 3-2 抗血清の評価

追加投与1週間後に眼底より採血し、抗血清とヒトFasリガンドとの結合を2-2記載の方法に従って測定した。図4が示すように、COS-1由来の部分精製Fasリガンド細胞外領域を投与したマウス(8-2)の抗血清は抗血清の希釈倍率に依存した吸光度の上昇がみられ、酵母由来Fasリガンド細胞外領域と結合することが確認された。また、1-3記載の方法に従いアポトーシス誘導活性に対する効果を検討したところ、強い抑制活性が認められた。

### 3-3 モノクローナル抗体の作製

酵母由来Fasリガンド細胞外領域との結合活性が確認されたマウス(8-2)に3-1記載のSDS-PAGEで調製したFasリガンド細胞外領域200 $\mu$ lを腹腔内に投与し、3日後「単クローン抗体実験操作入門、安東民衛・千葉丈著、講談社サイエンティフィク」記載の方法に従い細胞融合を行った。6日後、培養上清のスクリーニングを2種類の方法を用いて行った。すなわち、2-2記載の方法によりFasリガンドとの結合を測定した。また、1-4記載の抗M52ペプチド抗体とサンドイッチが可能な抗体を取得する目的でサンドイッチEIA系によるスクリーニングも平行して行った。まず、10 $\mu$ g/mlにPBSで希釈したDEAE精製ウサギ抗M52ペプチド抗体を50 $\mu$ l/ウェルずつイムノプレート(Maxisorp、Nunc社)に分注し、45℃で30分間処理し抗体を結合した。イオン交換水で5回洗浄後、0.1%BSA/PBS100 $\mu$ lを各ウェルに添加し室温で30分間ブロッキングした。ブロッキング液を廃棄した後、後述の4-1に記載の部分精製Fasリガンド細胞外領域200ng/mlを25 $\mu$ l加え、さらに培養上清25 $\mu$ lを添

加した。37℃で1時間反応後2回洗浄液で洗浄し、次に10%ウサギ血清/PBSで1000倍に希釈したHRPO標識抗マウスIgG抗体(ダコ社)を50μl添加し37℃で1時間反応した。洗浄液で5回洗浄後、さらにイオン交換水で2回洗浄し、0.027%過酸化水素を含む3mg/mlのオルトフェニレンジアミン/0.1Mマッキルベインバッファー(pH5.0)を50μl添加し10分間反応させ、1N塩酸50μlで反応を停止した。吸光度計により490nmの吸光度を測定した。その結果、両方法で4-1記載の可溶性Fasリガンドと反応する培養上清1ウェルを得た。反応性の得られたウェルを「単クローン抗体実験操作入門、安東民衛・千葉丈著、講談社サイエンティフィク」記載の限界希釈法によりクローニングした後、同様にスクリーニングを行いFasリガンド細胞外領域と反応し、抗M52ペプチド抗体とサンドイッチが可能な抗体F919-9-18(IgG2b/κ)を産生するハイブリドーマ1クローンを得た。

### 3-4 抗体の評価

F919-9-18抗体のアポトーシス抑制活性を1-3記載の方法に従い測定した。図5から明らかなように、F919-9-18は、国際特許出願公開WO95/13293の実施例15および16に記載の抗Fasリガンド抗体F883-1-1よりも百倍以上強い抑制活性を示し、この抑制活性は国際特許出願公開WO95/13293の実施例1に記載のhFas-Fcよりも強いものであった。

#### 4. サンドイッチEIA系の作製

##### 4-1 標準品の作製

標準品として用いるFasリガンド細胞外領域は以下のように調製した。

(1) 配列表の配列番号9のヒトFasリガンド細胞外領域179アミノ酸をコードするDNAを有するプラスミドpM1283の構築

まず、センスプライマー1 (TCTCTCGAGAAAAGAGAGCAGCTCTTCCACCTG) およびアンチセンスプライマー1 (AGGGAATTCCTATTAGAGCTTATA) を化学合成した。センスプライマー1は、ピキア酵母発現用プラスミドpPIC9 (Invitrogen社) の $\alpha$ -factorシグナル配列の一部をコードする塩基配列、ヒトFasリガンド細胞外領域のN末端配列、およびXhoIサイト (CTCGAG) を含む。アンチセンスプライマー1は、ヒトFasリガンド細胞外領域のC末端部分をコードする塩基配列、終始コドン (TAG) およびEcoRIサイト (GAATTC) を含む。

得られたプライマーをそれぞれ100 pmol、国際特許出願公開WO 95/13293の実施例18に記載の、ヒトFasリガンド細胞外領域179アミノ酸をコードするDNAを含むプラスミドpM1070を50 ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20 nmol、2.5ユニットのPfu DNAポリメラーゼと添付のPfuバッファー10  $\mu$ l (共にストラタジーン社) を含む100  $\mu$ lの溶液を調製した。DNAサーマルサイクラー (PCRシステム9600、パーキンエルマー社) を使用して、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとするPCRを30サ

イクル行った。得られたPCR産物をEcoRI、XhoIで二重消化し、pPIC9のEcoRI、XhoIサイトに組み込み、得られたプラスミドをpM1283と命名した。20  $\mu$ gのpM1283をBglIIで消化することにより直鎖状にし、ピキア酵母の形質転換に用いた。

## (2) ピキア酵母の形質転換

ピキア酵母GS115株 (Invitrogen社) をYPDプレート (1% (w/v) バクト イーストエキストラクト / 2% (w/v) ペプトン / 2% (w/v) D-グルコース / 2% バクト アガー) に植込み、30℃で2日間培養した後、単一コロニーを10mlのYPD (1% (w/v) バクト イーストエキストラクト / 2% (w/v) ペプトン / 2% (w/v) D-グルコース) に植込んだ。30℃、200 rpmで終夜振とう培養後、10  $\mu$ lを500mlのマイヤーに入れた200mlのYPDに植込み、さらに30℃、200 rpmで終夜振とう培養することによりOD600値が0.2~0.3の酵母培養液を得た。

酵母培養液を1,500 x g、室温で5分間遠心分離後、酵母を20mlの滅菌蒸留水に懸濁して洗浄し、1,500 x gで5分間遠心分離した。同様の操作でさらに酵母を20mlのSEDバッファー (0.95M ソルビトール / 23.75mM エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) (pH 8.0) / 50mM DTT) で1回、20mlの1M ソルビトールで1回洗浄した後、20mlのSCEバッファー (1M ソルビトール / 1mM EDTA / 10mM 塩酸ナトリウムバッファー、pH 5.8) に再懸濁した。7.5  $\mu$ lの3mg/ml チモリアーゼ (zymolyase、Invitrogen社)

を10 mlの酵母懸濁液に添加し、30℃で9分間インキュベートすることにより、5% SDS中におけるOD 600値の低下を指標として、70%の酵母をスフェロプラスト化した。750 x gで10分間遠心分離後、10 mlの1M ソルビトール溶液で1回、10 mlのCaS溶液(1M ソルビトール/10 mM トリス塩酸、pH 7.5/10 mM 塩化カルシウム(CaCl<sub>2</sub>))で1回洗浄した後、0.6 mlのCaS溶液に懸濁した。

0.1 mlのスフェロプラスト溶液に1.0 μgの直鎖状pM1283を添加し、室温で10分間インキュベートした。1 mlのポリエチレングリコール(PEG)/CaT(20%(w/v) PEG-3350/10 mM Tris, pH 7.5/10 mM CaCl<sub>2</sub>)溶液を添加し、室温で10分間インキュベートした後、750 x gで10分間遠心分離した。150 μlのSOS溶液(1M ソルビトール/0.3X YPD/10 mM CaCl<sub>2</sub>)をペレットに添加し、室温で20分間インキュベートした後、850 μlの1M ソルビトールを添加した。

45℃に保温した10 mlのヒスチジンを含まないRD溶液(0.186 g/ml ソルビトール/2.0 mg/ml D-グルコース/13.4 mg/ml イースト ナイトロジェン ベース/0.4 μg/ml ビオチン/50 μg/ml L-グルタミン酸/50 μg/ml L-メチオニン/50 μg/ml L-リジン/50 μg/ml L-ロイシン/50 μg/ml L-イソロイシン/1% アガー)に上記の溶液を100 μl添加後、RDBプレート(2%アガー/RD溶液)に重層し、30℃で4日間培養した。得られた形質転換体をMMプレート(13.4 mg/ml イースト ナイトロジェン ベース/

0.4  $\mu$ g/ml ビオチン/0.5% メタノール/1.5% アガー) およ  
びMDプレート (13.4 mg/ml イースト ナイトロジェン ベース  
/0.4  $\mu$ g/ml ビオチン/2% D-グルコース/1.5% アガー) に  
植込み、30℃で2日間培養した。培養後MDプレートでは増殖し、MMプレー  
トではほとんど増殖しない形質転換体を選択し発現に用いた。

(3) ヒト Fas リガンド細胞外領域の酵母を用いた生産

(2) で作製した形質転換体を50 mlの試験管に入れた10 mlのBMGY  
(1% (w/v) イーストエキストラクト/2% (w/v) ペプトン/  
13.4 mg/ml イースト ナイトロジェン ベース/0.4  $\mu$ g/ml  
ビオチン/1% (v/v) グリセロール/0.1 M リン酸カリウム  
バッファー, pH 6.0) 中で30℃で2日間振とう培養を行い、さらに500  
mlマイヤーに入れた100 mlのBMGY中に培養液を2 mlずつ添加し振と  
う培養することにより、OD<sub>600</sub>値が1.0~2.0の培養液2 Lを得た。  
4000 x g、室温で10分間遠心分離を行うことにより酵母を採取し、400  
mlのBMMY (1% (w/v) イースト イクストラクト/2% (w/v)  
ペプトン/13.4 mg/ml イースト ナイトロジェン ベース/0.4  
 $\mu$ g/ml ビオチン/0.5% (v/v) メタノール/0.1 M リン酸カ  
リウムバッファー, pH 6.0) に懸濁した。500 mlマイヤー8本にそれぞ  
れ50 mlずつ分注し、さらに30℃で2日間振とう培養を行い、13,000  
x g、10分間遠心分離を行うことによりヒト Fas リガンド細胞外領域を含む  
培養上清を得た。

次に0.22  $\mu$ mのフィルターでろ過した培養上清50 mlを80%飽和硫酸

により塩析し、4℃で1時間放置後、10000rpmで10分間遠心し沈殿を回収した。沈殿を0.15M NaClを含む0.067Mリン酸バッファー(pH7.2)に溶解し、透析した。透析後、10000rpmで10分間遠心し、さらに0.22μmのフィルターで不純物を除去した。2mlをゲルろ過カラム(Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 HR、ファルマシア社)にアプライし0.5mlの流速で溶出した。溶出液を2mlづつフラクションにとり、280nmの吸光度より蛋白質を検出し、1-3に記載の方法により各フラクション30μlを用いてアポトーシス誘導活性を測定した。また、2-1記載の方法に従い各フラクション50μlをイムノプレートに感作し抗M52ペプチド抗体でFasリガンドを検出した。図6はゲルろ過のチャートを示しており、抗M52ペプチド抗体では2カ所のフラクションに抗体結合活性が認められたが、アポトーシス誘導活性は低分子量側のフラクションにのみ認められた。活性の認められたフラクションを4-20%SDS-PAGE(テフコ社)により検定したところ、Fasリガンド細胞外領域の分子量である3万付近のバンドはアポトーシス誘導活性を示した低分子量側のフラクションにのみ認められ、高分子量側のフラクションには分子量14万以上のバンドが検出され、この分画はFasリガンドが凝集したものと推定された(以下、酵母Fasリガンド凝集物ということがある)。アポトーシス誘導活性のあるフラクションを集め、セントリコン-10(アミコン社)で濃縮し、BSAを標準品としてプロテインアッセイ(バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)で濃度を算出した。これを部分精製品とした。

精製Fasリガンド細胞外領域は酵母由来の培養上清を80%飽和硫酸で塩析

後、0.15M NaClを含む50mM Tris-HCl (pH8.0)で透析し、hFas-Fcを結合したプロテインA-セルロファイン(チッソ(株)社)アフィニティーカラム(5ml)にアプライし以下のようにして得た。なお、該アフィニティーカラムは、国際特許出願公開WO95/13293の実施例1に記載のhFas-FcをプロテインA-セルロファイン(チッソ(株)社)の添付文書に記載の方法に従い作製した。洗浄後、2M NaClを含む50mM Tris-HCl (pH8.0)で溶出し、280nmのピークを回収し、50mM MESバッファー(pH6.0)に透析した。次に、Mono S(HR5/5、ファルマシア社)にアプライし、500mM NaClを含む50mM MESバッファー(pH6.0)で溶出し、280nmのピークを回収しセントリコン-10(アミコン社)で濃縮した。PBSで透析し、BSAを標準品としてLowry法により蛋白濃度を算出した。精製Fasリガンド細胞外領域38 $\mu$ g(蛋白濃度300 $\mu$ g/ml)を得た。

#### 4-2 ポリクローナル抗体によるサンドイッチEIA系の作製

DEAE精製ウサギ抗M52ペプチド抗体と抗Fasリガンド抗血清(ロット8-2)を用いてサンドイッチEIA系を作製した。まず、PBSで10 $\mu$ g/mlに希釈したDEAE精製ウサギM52ペプチド抗体を50 $\mu$ l/ウェルづつイムノプレート(Maxisorp、Nunc社)に分注し、45℃で30分間処理し結合した。イオン交換水で5回洗浄後、0.1%BSA/PBSを100 $\mu$ l/ウェル添加し室温で30分間ブロッキングした。ブロッキング液を廃棄した後、0.1%BSA/PBSで希釈した精製Fasリガンド細胞外領域0~250ng/mlを25 $\mu$ l加え、さらに0.1%BSA/PBSで500倍



に希釈した抗Fasリガンド抗血清（ロット8-2）を25  $\mu$ l 添加した。37℃で1時間反応後、0.005% Tween 20を含む0.9% NaClで2回洗浄し、次に10%ウサギ血清/PBSで1000倍に希釈したHRPO標識抗マウスIgG抗体（ダコ社）を50  $\mu$ l 添加し37℃で1時間反応させた。洗浄液で5回洗浄後、さらにイオン交換水で2回洗浄し、0.027%過酸化水素を含む3 mg/mlのオルトフェニレンジアミン/0.1 Mマッキルベインバッファー（pH 5.0）を50  $\mu$ l 添加し10分間反応させ、1 N塩酸50  $\mu$ l で反応を停止した。吸光度計により490 nmの吸光度を測定した。図7は作成した標準曲線を示している。本系は、Fasリガンドを高感度かつ定量的に測定可能と考えられた。

#### 4-3 モノクローナル抗体によるサンドイッチEIA系の作製

モノクローナル抗体を用いたサンドイッチEIA系は以下のように作製した。

まず、中根ら（Immunofluorescence and Related Staining Techniques, W. Knapp, K. Holubar and, G. Wick eds. 1978）の方法に従い、モノクローナル抗体をペルオキシダーゼで標識した。すなわち、ペルオキシダーゼ（RZ 3.11、東洋紡（株））を6 mg秤量し、1.5 mlの蒸留水で溶解した。次に蒸留水で溶解した0.1 Mメタ過ヨウ素酸ナトリウムを0.3 ml 添加し室温で15分間静置し、続いて蒸留水で溶解した1.5%エチレングリコール0.3 ml を添加し室温で20分間静置した。この溶液を0.001 Mの酢酸バッファー（pH 4.4）に対して4℃で一夜透析した。

得られた活性化ペルオキシダーゼ  $127 \mu\text{l}$  (ペルオキシダーゼ  $400 \mu\text{g}$  相当) に  $1\text{M}$  炭酸バッファー ( $\text{pH } 9.5$ ) を  $7 \mu\text{l}$  添加し、続けて  $0.01\text{M}$  炭酸バッファー ( $\text{pH } 9.5$ ) で透析した精製モノクローナル抗体 ( $2 \sim 3 \text{mg}/\text{ml}$  のもの)  $500 \mu\text{g}$  相当を添加し  $25^\circ\text{C}$  にて  $2$  時間反応させた。次に、 $0.01\text{M}$  炭酸緩衝液 ( $\text{pH } 9.5$ ) で溶解した  $4 \text{mg}/\text{ml}$  の水素化ホウ素ナトリウムを  $12 \mu\text{l}$  添加し  $4^\circ\text{C}$  で  $2$  時間静置した。次に  $0.076\text{M}$  の PBS ( $\text{pH } 6.4$ ) に対して  $4^\circ\text{C}$  で一夜透析し、得られたペルオキシダーゼ標識抗体に半量の  $18\%$  シュークロース、 $0.3\%$  BSA/PBS を添加し  $-20^\circ\text{C}$  にて保存した。

次に、PBS で  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した F918 シリーズまたは F919-9-18 モノクローナル抗体を  $50 \mu\text{l}$  / ウェルずつイムノプレート (Maxisorp、Nunc 社) に分注し、 $45^\circ\text{C}$  で  $30$  分間処理し抗体を結合させた。イオン交換水で  $5$  回洗浄後、 $0.1\%$  BSA/PBS を添加し室温で  $30$  分間ブロッキングした。ブロッキング液を廃棄した後、 $0.1\%$  BSA/PBS で希釈した精製 Fas リガンド細胞外領域  $0 \sim 100 \text{ng}/\text{ml}$  を  $25 \mu\text{l}$  加え、次に  $10\%$  ウサギ血清/PBS で  $0.5 \sim 2 \mu\text{g}/\text{ml}$  に希釈した HRP O 標識抗体 (F918 シリーズあるいは F919-9-18) を  $25 \mu\text{l}$  添加し  $37^\circ\text{C}$  で  $1$  時間反応させた。 $0.005\%$  Tween 20 を含む  $0.9\%$  NaCl 洗浄液で  $5$  回洗浄後さらにイオン交換水で  $2$  回洗浄し、 $0.027\%$  過酸化水素を含む  $3 \text{mg}/\text{ml}$  のオルトフェニレンジアミン/ $0.1\text{M}$  マッキルベインバッファー ( $\text{pH } 5.0$ ) を  $50 \mu\text{l}$  添加し  $10$  分間反応させ、 $1\text{N}$  塩酸  $50 \mu\text{l}$  で反応を停止した。吸光度計により  $490 \text{nm}$  の吸光度を測定した。表 2 はモノクローナ

ル抗体の組み合わせおよびE I Aの結果を示したものであり、抗M52ペプチドモノクローナル抗体（F918シリーズ）と抗Fasリガンド抗体（F919）による組み合わせが可能であることを示している。また、抗M52ペプチドモノクローナル抗体同士のサンドイッチ系であるF918-9-4/F918-7-3や同じ抗体であるF919-9-18/F919-9-18でもサンドイッチ系が可能であった。なお、表2において◎は高反応性を、○は中反応性を、△は低反応性を、×は反応性が認められなかったことを示す。表2においてウサギ抗M52およびウサギ抗M57は、M52およびM57ペプチドで免疫したウサギの抗血清である。

表2 各種抗FasリガンD抗体のサンドイッチEIA系での組み合わせ

上 下	ウサギ 抗M52	ウサギ 抗M57	F918-9-4	F918-7-3	F918-23-1	F918-4-5	F918-17-1	F918-2-4	F918-20-2	F919-9-18
ウサギ 抗M52	×	×	×	×	×	△	△	△	×	◎
ウサギ 抗M57	×	×	×	×	×	×	△	×	×	○
F918-9-4	×	×	×	△	×	×	×	×	×	◎
F918-7-3	×	×	○	×	×	△	○	○	△	◎
F918-23-1	×	×	×	×	×	×	×	×	×	△
F918-4-5	×	×	×	○	×	×	×	×	×	◎
F918-17-1	×	×	×	△	×	×	×	×	×	◎
F918-2-4	×	×	×	○	×	×	×	×	×	◎
F918-20-2	△	×	×	○	×	×	×	×	×	◎
F919-9-18	○	×	◎	◎	△	○	○	○	△	◎

上：標識抗体 下：固相化抗体

## 5. 測定系の評価

### 5-1 各種 Fas リガンドの作製

ヒト Fas リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチド nd 4 2 および cd 1 7 9 を国際特許出願公開 WO 9 5 / 1 3 2 9 3 の実施例 2 1 に記載の方法で発現させた。なお、国際特許出願公開公報中ではポリペプチド nd 4 2 および cd 1 7 9 はそれぞれ ND 4 2 および CD 1 7 9 として表示されている。また、ヒト Fas リガンドの細胞外領域の欠失変異体であるポリペプチド nd 5、nd 1 2、nd 2 0、nd 3 2 および nd 4 9、ヒト Fas リガンドの細胞外領域の置換変異体である L 1 7 9 F ならびに遊離型 Fas リガンドを以下の方法で発現させた。なお、nd 5、nd 1 2、nd 2 0、nd 3 2、nd 4 2 および nd 4 9 は、配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列の N 末端から、それぞれ 5 アミノ酸、1 2 アミノ酸、2 0 アミノ酸、3 2 アミノ酸、4 2 アミノ酸および 4 9 アミノ酸が欠失したそれぞれ 6、1 3、2 1、3 3、4 3 および 5 0 番目のアミノ酸から 1 7 9 番目のアミノ酸までのアミノ酸配列を有するポリペプチドである。また、ポリペプチド cd 1 7 9 は配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列の C 末端から 1 アミノ酸が欠失したアミノ酸配列、すなわちアミノ酸番号 1 から 1 7 8 までのアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、ポリペプチド L 1 7 9 F は配列表の配列番号 9 に記載のアミノ酸配列の C 末端アミノ酸残基であるロイシンがフェニルアラニンに置換されたポリペプチドである。また、遊離型 Fas リガンドは、遺伝子として Fas リガンド全長を有するプラスミドを導入された COS-1 細胞表面上に発現した Fas リガンドが培養上清中に遊離したものである。

## (1) プラスミドpM1081の作製

ヒトFas抗原シグナルペプチドとヒトFasリガンド細胞外領域をコードするプラスミドpM1081を以下の方法で作製した。このpM1081は、サイレントミューテーションにより、ヒトFas抗原シグナルペプチドをコードする塩基配列中にSpeI、PshAI認識配列が導入され、またヒトFasリガンドをコードする塩基配列中にPstI認識配列が導入されている。

まず、センスプライマー2 (TGCGAATTCACCATGCTGGGCA TCTGG) およびアンチセンスプライマー2 (CTTCTGCAGGTGGA AGAGCTGAGCGACACTAGTCAGAACCAGAGG) を化学合成した。このセンスプライマー2は、ヒトFas抗原シグナルペプチドをコードする配列の5'末端領域とEcoRIサイト(GAATTC)を含んでいる。また、アンチセンスプライマー2は、ヒトFasリガンド細胞外領域のN末端側とヒトFas抗原シグナルペプチドのC末端側をコードする塩基配列およびPstIサイト(CTGCAG)、SpeIサイト(ACTAGT)、PshAIサイト(GACTAGTGTC)を含んでいる。得られたアンチセンスプライマー2と、センスプライマー2とを、それぞれ100 pmol、ヒトFas抗原をコードするDNA (イトウ N、(Itoh N) 等、Cell、66巻、233-243頁、1991年) を含むプラスミドpBLF58-1を50 ng、PfuDNAポリメラーゼを2.5 U、添付のPfuバッファー (共に、ストラタジーン) を10  $\mu$ l含む100  $\mu$ lの溶液を調製した。DNAサーマルサイクラー (PCRシステム9600、パーキンエルマー) を使用して、94℃、30秒; 55℃、30秒; 72℃、1分を1サイクルとするPCR

を30サイクル行った。PCR産物をEcoRIおよびPstIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約70bpのDNA断片を回収し、キアエックスキット (Qiagen社) を用いてDNAを精製した。国際特許出願公開WO95/13293の実施例18に記載のプラスミドpM1067のEcoRIサイトおよびPstIサイト間に、上述の約70bpのDNA断片を挿入した。

得られたプラスミドの塩基配列を確認したところ、EcoRIサイトとSpeIサイトとの間に16bpの欠損があった。そこで、目的とするEcoRIサイトからSpeIサイトまでの配列を構築するためのセンスオリゴヌクレオチド1 (AATTCACCATGCTGGGCATCTGGACCCTCCTACCTCTGGTTCTGA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド1 (CTAGTCAGAACCCAGAGGTAGGAGGGTCCAGATGCCCAGCATGGTG) を化学合成し、それぞれを1nmolずつ含む20 $\mu$ lのTE溶液を調製した。このTE溶液を95 $^{\circ}$ Cで5分間加熱後、16 $^{\circ}$ Cまで徐冷することにより、これらのオリゴヌクレオチドをアニーリングさせ、二本鎖DNAの両端にそれぞれEcoRI切断配列とSpeI切断配列を持つDNA断片を得た。これを上述の16bp欠損したプラスミドのEcoRIサイトとSpeIサイト間に挿入し、pM1081を得た。

## (2) プラスミドpM1291の作製

まず、センスプライマー3 (CTGACTAGTGTCGCTCAGAAGGAGCTGGCA) およびアンチセンスプライマー3 (GTCTTCCCATTCAGAGGCATGG) を化学合成した。このセンスプライマー3は、ヒト

F a s 抗原シグナルペプチドのC末端側に位置するアミノ酸配列と、ヒトF a s リガンド細胞外領域のN末端側6番目から10番目までのアミノ酸配列をコードする塩基配列とS p e I サイト (A C T A G T)、P s h A I サイト (G A C T A G T G T C) を含んでいる。また、アンチセンスプライマー3は、ヒトF a s リガンド細胞外領域のc D N A の塩基配列の164番目から186番目までの相補配列で、B s t X I サイト (C C A G A G G C A T G G) を含んでいる。得られたセンスプライマー3およびアンチセンスプライマー3をそれぞれ100 p m o l、国際特許出願公開WO 95/13293の実施例12に記載のp B X - h F L 1 を50 n g、d A T P、d C T P、d G T P、d T T P をそれぞれ20 n m o l、2.5ユニットのP f u D N A ポリメラーゼおよび添付のP f u バッファー（共にストラタジーン）10  $\mu$  l を含む100  $\mu$  l の溶液を調製した。上記(1)と同様にP C R を行い、得られたP C R 産物をS p e I、B s t X I で二重消化した。これを(1)で作製したプラスミドp M 1 0 8 1 のS p e I、B s t X I サイトに組み込み、得られたプラスミドをp M 1 2 9 1 と命名した。

### (3) プラスミドp M 1 2 9 2 の作製

まず、センスプライマー4 (C T G A C T A G T G T C G C T C G A G A G T C T A C C A G C) を化学合成した。このセンスプライマー4は、ヒトF a s 抗原シグナルペプチドのC末端側に位置するアミノ酸配列と、ヒトF a s リガンド細胞外領域のN末端側13番目から17番目までのアミノ酸配列をコードする塩基配列とS p e I サイト (A C T A G T)、P s h A I サイト (G A C T A G T G T C) を含んでいる。



得られたセンスプライマー 4 および (2) のアンチセンスプライマー 3 を使用して (2) と同様に PCR を行い、得られた PCR 産物を *Spe* I、*Bst* X I で二重消化した。これを (1) で作製したプラスミド pM1081 の *Spe* I、*Bst* X I サイトに組み込み、得られたプラスミドを pM1292 と命名した。

#### (4) プラスミド pM1293 の作製

まず、センスプライマー 5 (CTGACTAGTGTCGCTACAGCATCATCTTTG) を化学合成した。このセンスプライマー 5 は、ヒト Fas 抗原シグナルペプチドの C 末端側に位置するアミノ酸配列と、ヒト Fas リガンド細胞外領域の N 末端側 21 番目から 25 番目までのアミノ酸配列をコードする塩基配列と *Spe* I サイト (ACTAGT)、*Psh* A I サイト (GACTAGTGTC) を含んでいる。

得られたセンスプライマー 5 と (2) で作製したアンチセンスプライマー 3 を用い、(2) と同様に PCR を行った。得られた PCR 産物を *Spe* I、*Bst* X I で二重消化し、pM1081 の *Spe* I、*Bst* X I サイトに組み込み、得られたプラスミドを pM1293 と命名した。

#### (5) プラスミド pM1295 の作製

まず、センスプライマー 6 (CTGACTAGTGTCGCTAGTCCACCCCTGAA) を化学合成した。このセンスプライマー 6 は、ヒト Fas 抗原シグナルペプチドの C 末端側に位置するアミノ酸配列と、ヒト Fas リガンド細胞外領域の N 末端側 33 番目から 37 番目までのアミノ酸配列をコードする塩基配列と *Spe* I サイト (ACTAGT)、*Psh* A I サイト (GACTAGT

GTC) を含んでいる。

得られたセンスプライマー6と、(2)で作製したアンチセンスプライマー3を用い、(2)と同様にPCRを行った。得られたPCR産物をSpeI、BstXIで二重消化し、pM1081のSpeI、BstXIサイトに組み込み、得られたプラスミドをpM1295と命名した。

(6) プラスミドpM1296、pM1297、pM1298、pM1300の作製

(2)から(5)で得られプラスミドpM1291、pM1292、pM1293、pM1295をそれぞれEcoRI、KpnIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。それぞれ約580、570、540、500bpのDNA断片を回収し、キアジェン(QIAGEN)のキアエックス(QIAEX)キットを使用してDNAを精製した。動物細胞発現ベクターpEF-BOS(ミズシマおよびナガタ(Mizushima & Nagata, Nucleic Acids Res., 18巻、5322頁、1990年)にdhfr遺伝子を組換え修飾したプラスミドpM1103のEcoRI、KpnIサイト間に、上述の約580、570、540、500bpのDNA断片を組み込み、得られたプラスミドをそれぞれpM1296、pM1297、pM1298、pM1300と命名した。

作製したプラスミドの塩基配列をPRISM Dye Terminator Cycle Sequencingキット(パーキンエルマー)とDNAシーケンサ(モデル373A、パーキンエルマー)を使用して決定した。その結果、プラスミドpM1296、pM1297、pM1298、pM1300には

それぞれ、ヒトFasリガンドの細胞外領域のN末端より数えて6、13、21、33番目以降のアミノ酸配列をコードする国際特許出願PCT/JP95/00883の配列表の配列番号1、2、3および4に記載のDNAが含まれていることが確認された。本発明者らは、公知方法にてプラスミドpM1297およびpM1300で、大腸菌HB101を形質転換させ、得られた形質転換体大腸菌HB101 (pM1297)、HB101 (pM1300) を、生命工学工業技術研究所へ、1995年4月26日付で寄託している (受託番号FERM BP-5083、FERM BP-5084)。

(7) ヒトFasリガンド細胞外領域をコードするDNAを有するプラスミドpM1070-pUC118の作製

まず、センスプライマー2 (TGCGAATTCACCATGCTGGGCACTCTGG) およびアンチセンスプライマー4 (AACCTGCAGGTGGAAGAGCTGAGCAACAGACGTAAG) を化学合成した。センスプライマー2はEcoRIサイト (GAATTC) とヒトFas抗原シグナルペプチドのN末端5アミノ酸をコードする塩基配列を含み、アンチセンスプライマー4はPstIサイト (CTGCAG) とヒトFasリガンド細胞外領域のN末端4アミノ酸をコードする塩基配列とヒトFas抗原シグナルペプチドのC末端5アミノ酸をコードする塩基配列を含む。

得られたプライマーをそれぞれ100 pmol、ヒトFas抗原のアミノ酸をコードするDNA (イトウ N、(Itoh N) 等、Cell、66巻、233-243頁、1991年) を含むプラスミドpBLF58-1を50 ng、dATP、dCTP、dGTP、dTTPをそれぞれ20 nmol、

2. 5ユニットのPfu DNAポリメラーゼと添付のPfuバッファー10 $\mu$ l（共にストラタジーン）を含む100 $\mu$ lの溶液を調製した。DNAサーマルサイクラー（PCRシステム9600、パーキンエルマー）を使用して、94℃で30秒、55℃で30秒、72℃で1分を1サイクルとするPCRを30サイクル行い、得られたPCR産物をEcoRI、PstIで二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約70bpのDNA断片を回収し、キアエックスキット（QIAGEN）を用いてDNAを精製した。国際出願公開WO95/13293の実施例18に記載のプラスミドpM1067をEcoRI、PstIで二重消化し、上述の約70bpのDNA断片を挿入し、プラスミドpM1070-pUC118を得た。

（8）ヒトFasリガンド細胞外領域のC末端アミノ酸変異体L179FをコードするDNAを有するプラスミドpM1090の作製

まず、センスプライマー7（GAGCTACTGCACTACTGGGC）およびアンチセンスプライマー5（CTTGGTACCCTATTAGAACTTATATAAGCC）を化学合成した。センスプライマー7は、ヒトFasリガンド細胞外領域の129番目から135番目付近のアミノ酸をコードする20bpのDNAを含み、6bp下流にApaIサイト（GGGCCC）が位置している。アンチセンスプライマー5は、ヒトFasリガンド細胞外領域のC末端175番目から178番目までのアミノ酸をコードする塩基配列を含み、179番目のロイシンをコードする塩基配列（CTC）をフェニルアラニンをコードする塩基配列（TTC）に置換してある。さらに、終始コドン（TAA、TAG）およびKpnIサイト（GGTACC）を含む。

得られたセンスプライマー 7 およびアンチセンスプライマー 5 を用いて、(2) と同様に PCR を行った。得られた PCR 産物を *Apa* I、*Kpn* I で二重消化し、アガロースゲル電気泳動に供した。約 130 bp の DNA 断片を回収し、キアエックスキット (QIAGEN) を用いて DNA を精製した。ヒト Fas リガンド細胞外領域をコードする DNA を含む pM1070 pUC118 を *Apa* I、*Kpn* I で二重消化し、上述の約 130 bp の DNA 断片を挿入した。得られたプラスミドを *Eco* RI、*Kpn* I で二重消化後、アガロースゲル電気泳動に供し、約 600 bp の DNA 断片をキアエックスキットを用いて精製した。動物細胞発現ベクター pEF-BOS (ミズシマおよびナガタ (Mizushima & Nagata)、Nucleic Acids Res., 18 巻、5322 頁、1990 年) に DHFR 遺伝子を組み換えたプラスミド pM1103 のクローニングサイトの *Eco* RI、*Kpn* I サイト間に上述の約 600 bp の DNA 断片を組み込み、得られたプラスミドを pM1090 と命名した。

作製したプラスミドの塩基配列を PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing キット (パーキンエルマー) と DNA シーケンサ (モデル 373A、パーキンエルマー) を使用して決定した。その結果、プラスミド pM1090 には、ヒト Fas リガンドの細胞外領域のアミノ酸配列 (配列表の配列番号 9) の C 末端アミノ酸残基であるロイシンがフェニルアラニンに置換されたアミノ酸配列をコードする DNA が含まれていることが確認された。

## (9) COS-1細胞への導入

pM1090、pM1296、pM1297、pM1298、pM1300および国際特許出願公開WO95/13293の実施例18に記載のpM1070、国際特許出願公開WO95/13293の実施例12に記載のpEX-hFL1を使用して、以下の方法で形質転換体COS-1/pM1090、COS-1/pM1296、COS-1/pM1297、COS-1/pM1298、COS-1/pM1300、COS-1/pM1070、COS-1/pEX-hFL1を作製した。すなわち、それぞれのプラスミドDNA 8.1  $\mu$ gを40  $\mu$ lのTris/EDTA溶液に溶解した。そのうちの2.5  $\mu$ lに、それぞれ0.2 mg/ml DEAE-デキストランおよび50 mM Tris-HCl (pH 7.4) を含有するD-MEM (日水製薬) 0.7 mlを添加し、DNA-DEAEデキストラン混合液を作製した。6ウェルプレートでセミコンフルエントまで単層培養したCOS-1細胞にDNA-DEAEデキストラン混合液を添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下で、37℃にて培養し、形質転換体COS-1/pM1090、COS-1/pM1296、COS-1/pM1297、COS-1/pM1298、COS-1/pM1300、COS-1/pM1070、COS-1/pEX-hFL1を得た。

上記で得た形質転換体COS-1/pM1090、COS-1/pM1296、COS-1/pM1297、COS-1/pM1298、COS-1/pM1300、COS-1/pM1070、COS-1/pEX-hFL1を1% FCSを含むD-MEM中で37℃で72時間培養した後、培養上清をそれ

ぞれ回収した。各培養上清中のアポトーシス誘導活性は実施例 1 - 3 に記載の方法で測定された。

#### (10) 遊離型 Fas リガンド

遊離型 Fas リガンドは、国際特許出願公開 WO 95 / 13293 の実施例 12 に記載のプラスミド pEX-hFL1 を上記 (9) 記載の方法に従い、COS-1 細胞に導入して得られた形質転換体 COS-1 / pEX-hFL1 の培養上清より回収したものを使用した (COS 遊離型と称することがある)。また、特異的マトリックスメタロプロテアーゼ様酵素が膜結合 Fas リガンドを切断してその可溶 (遊離) 型を生成する事が報告されており (タナカ M. 等、EMBO J. 14 巻、1129-1135 頁、1995 年およびタナカ M. 等、Nature Medicine、2 巻、317-322 頁、1996 年)、この遊離型 Fas リガンドの N 末端アミノ酸は、Fas リガンド細胞外領域の 27 アミノ酸を欠失した第 28 番目のグルタミンであった。

#### 5-2 各種 Fas リガンドとの反応性

各種 Fas リガンドを用いて 8 種類のサンドイッチ EIA 系の抗原特異性を検討した。Fas リガンドとして Fas リガンド細胞外領域の各種欠失体および置換体、4-1 記載の凝集した Fas リガンド細胞外領域 (酵母 Fas L 凝集物) および精製した Fas リガンド細胞外領域 (酵母 Fas L)、3-1 記載の COS-1 細胞由来の Fas リガンド細胞外領域 (COS s Fas L)、ならびに遊離型 Fas リガンド (COS 遊離型) を用いて、それぞれに対する反応性を測定した。

表 3 から明らかなように、M52 ペプチドを投与して得られたモノクローナル

抗体にはM52ペプチドのN末端領域を認識しているグループ(F918-7-3)とC末端領域を認識しているグループ(F918-9-4)が存在した。また、F919-9-18はM52ペプチド領域を持たないFasリガンド細胞外領域とも反応することから、M52ペプチドの位置よりもさらにFasリガンドのC末端側にその結合領域が存在し、かつアポトーシス誘導活性を有するもののみと結合することが明らかとなった。なお、○は高反応性を、△は低反応性を、×は反応しないことを示す。



表3 各種サンドイッチEIA系における各種Fasリガンドの反応性

	酵母FasL	酵母FasL 凝集物	COS sFasL	COS 遊離型	nd5	nd12	nd20	nd32	nd42	nd49	cd179	L179F
アポトース活性	あり	なし	あり	あり	あり	あり	あり	あり	あり	なし	なし	あり
M52	○	×	○	×	○	○	○	×	×	×	×	○
F919serum	○	×	○	×	○	○	○	×	×	×	○	○
F918-7-3	○	×	○	×	○	○	○	×	×	×	×	○
F918-9-4-HRP	○	×	○	×	○	○	○	×	×	×	×	○
M52	○	×	○	△	○	○	○	×	×	×	×	△
F919-9-18-HRP	○	×	○	△	○	○	○	×	×	×	×	△
F919-9-18	○	×	○	×	○	○	○	×	×	×	×	△
F918-7-3-HRP	○	×	○	×	○	○	○	×	×	×	×	○
F918-7-3	○	×	○	△	○	○	○	×	×	×	×	○
F919-9-18-HRP	○	×	○	△	○	○	○	×	×	×	×	○
F918-9-4	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
F919-9-18-HRP	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
F918-4-5	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
F919-9-18-HRP	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
F919-9-18	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○
F919-9-18-HRP	○	×	○	○	○	○	○	○	×	×	×	○

### 5-3 正常人血清の影響

4-2 記載の測定法を用いてヒト血清中のF a s リガンドの測定を行うため、ヒト血清の影響を検討した。実施例4-1記載の部分精製F a s リガンド細胞外領域を0.1% BSA/PBSまたは正常ヒト血清で希釈し標準曲線を作製した。図8に示すように、正常ヒト血清でF a s リガンド無添加のバックグラウンドが0.1% BSA/PBS希釈剤よりも若干低値を示した以外両者に差は認められず、血清の影響はないと考えられた。

### 6. 各種疾患患者血清中F a s リガンドの測定

各種の疾患の患者血清を用いて4-2記載の測定法により血中F a s リガンドの測定を行った。標準品として4-1記載の精製F a s リガンド細胞外領域を正常ヒト血清で希釈したもの(0, 10, 50, 100, 200 ng/ml)を使用し、正常人血清26例、B型肝炎患者血清36例、C型肝炎患者血清13例、HIV抗体陽性患者血清14例、その他各種疾患患者の血清を測定した。図9は各血清での測定値を示したものであり、正常人は測定感度(約1 ng/ml)以下であったが、B型肝炎患者(9/36)、C型肝炎患者(4/13)、HIV抗体陽性患者(1/14)、(( )内はカットオフ値を1 ng/mlとした場合の陽性例/測定数を示す)に高値例がみられた他、マラリア患者(2/10)、関節リウマチ患者(3/12)および抗DNA抗体陽性自己免疫疾患患者(1/1)においても陽性例が認められ、これらの疾患でF a s リガンドが病因または病態と関連していることが示唆された。

## 7. マウスF919-9-18抗体可変領域cDNAのクローニングおよび配列決定

マウスF919-9-18抗体（以下F919と略す）の重鎖及び軽鎖可変ドメイン遺伝子のcDNAを、（コーら、J. Immunol. 148:1149（1992）及び共通に譲渡された米国特許出願シリアル番号第07/634,278号明細書参照）に記載の如くのアンカーされたポリメラーゼ連鎖反応を用い、定常領域にアニールされる3'プライマー、及びcDNAに付加されたdG尾部にアニールされる5'プライマーを用いてクローン化した。PCR増幅された遺伝子フラグメントは、pUC18ベクター中に挿入化された。軽鎖および重鎖可変領域cDNAの両方に対して、数個の独立クローンからヌクレオチド配列を決定した。重鎖に対しては、マウス重鎖可変領域に特徴的な単一の配列が同定された。軽鎖に対しては、ともにマウス軽鎖可変領域配列に相同2つの特長的配列が同定された。しかし、1つの配列は、V-J結合におけるフレームシフトを生じるヌクレオチドの欠失のため機能的ではなく、また非産生アリアルとして同定された。もう一方の配列はマウスカッパー鎖可変領域に典型的であった。各配列の数個のクローンが配列決定され、それぞれ同一であることがわかった。重鎖および機能的軽鎖の可変ドメインcDNA配列ならびにそれらから導かれるアミノ酸配列を図11および図10に示す。

## 8. ヒト化F919抗体可変領域のコンピューターモデリングによる設計

ヒト化抗体中で高い結合親和性を保持するために、クイーンらの一般的方法に従った（クイーンら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:10029（1989）及びWO90/07861、（本引例をもって明細書の

一部と成す) 参照)。フレームワーク残基の選択は高親和性を保持するために重要である。原則として、いかなるヒト抗体からのフレームワーク配列もCDR移植のための鋳型として使用することができる。しかしながら、そのようなフレームワークへの直接的なCDR置換は抗原への結合親和性の有意な損失を招くことが示されている (Glaser等, J. Immunol.、149:2606 (1992); Tempest等, Biotechnology、9:266 (1992); Shalaby等, J. Exp. Med. 17:217 (1992))。受容体ヒト抗体が元のネズミ供与体抗体と相同であればあるほど、ネズミCDRをヒトフレームワークと組み合わせることが親和性を減少する歪みをCDR中に導入することになるということがより少ないと見込まれる。抗体配列データベースに対する配列相同検索に基づいて、ヒト抗体Euが、マウスF919抗体に高いフレームワーク相同性を提供するものとして選ばれたが他の高度に相同なヒト抗体鎖、特にヒトサブグループIからのカッパー軽鎖およびヒトサブグループIからの重鎖も同様に適しているであろう (Kabat等、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., U. S. Department of Health and Human Services, 1991)。

コンピュータプログラムENCAD (レビット、J. Mol. Biol. 168:595 (1983)、本引例をもって明細書の一部と成す) を、F919可変領域の分子モデルを構築するために用いた。モデルは、CDRと潜在的に相互作用するのに十分にCDRに近接したところの、マウスF919フレームワー

ク中のアミノ酸を決定するために用いた。ヒト化F919軽鎖及び重鎖可変領域をデザインするために、マウスF919抗体からのCDRが、ヒトEu抗体のFR中に移植された。コンピューターモデルがCDRとの有意な接触を示したフレームワークの位置において、元のヒトフレームワークアミノ酸に代わってマウス抗体からのアミノ酸へ置換された。ヒト化F919に対しては、この置換は、重鎖の残基27、30、45、46、68、70、72および97ならびに軽鎖の残基7、22、70、71および87においておこなわれた。ヒト化軽鎖の追加のバージョン(version 2)を2つのヒトフレームワーク残基を保持するように、すなわち、version 1の位置7および22におけるT(スレオニン)およびS(セリン)をversion 2では各々SおよびTに置換して、構築した。後に示す結果から、2つのバージョンの軽鎖の間には結合親和性に大きな差はないことが示された。よって、より多くのヒト残基を保持しているという観点からは、version 2は、ヒト化軽鎖としては好ましい選択である。さらに、ヒト抗体のデータベース中でその位置においてまれにしか現れないフレームワークアミノ酸残基はそれらの位置におけるヒトコンセンサスアミノ酸によって置換した。ヒト化F919抗体に対しては、この置換は、重鎖の残基74、93、95、98、107、108、109および111ならびに軽鎖の残基48および63においておこなわれた。

ヒト化F919抗体重鎖および軽鎖(version 2)可変領域の配列を図13および12に示した。しかしながら、多くの潜在的にCDRと接触し得る残基は、抗体の抗原に対する実質的な親和性をなお保持させるであろう他のアミノ酸への置換を受ける余地がある。下表(表4)は、代替のアミノ酸も適している

であろうフレームワーク中の多くの位置を一覧にする（LCは軽鎖を、HCは重鎖を示す）。

表 4

位置	ヒト化F 9 1 9	選択肢
LC-7	S	T
LC-22	T	S
LC-70	N	E, D
LC-71	Y	F
LC-87	F	Y
HC-27	Y	G
HC-30	T	S
HC-45	F	L
HC-46	K	E
HC-68	F	V
HC-70	F	I
HC-72	L	A
HC-97	V	A

同様に、ヒト化F 9 1 9 抗体重鎖および軽鎖中のCDRと接触していないフレームワーク残基の多くは、ヒト化抗体の親和性またはフレームワーク残基の

多くは、ヒト化抗体の親和性または非免疫原性を有意に損なうことなく、ヒトE $\mu$ 抗体、他のヒト抗体、マウスF 9 1 9抗体または他のマウス抗体の対応する位置からのアミノ酸の置換を受けることができる。下表(表5)は、代替のアミノ酸も適しているであろうフレームワーク中の追加の位置を一覧にする。

表 5

位置	ヒト化F 9 1 9	選択肢
LC-48	I	M
LC-63	S	I
HC-74	T	E
HC-93	V	F, T
HC-95	Y	F
HC-98	R	G
HC-107	W	E
HC-108	G	Y
HC-109	Q	N
HC-111	T	G

代替のアミノ酸の組合せの選択は、親和性、特異性、非免疫原性、製造の容易性および他の望ましい性質の様々な組合せを有するヒト化F 9 1 9抗体のバージョンを作製するために使用されるであろう。このようにして、上表中の例

は、限定のためではなく、実例として提供される。

## 9. ヒト化F 9 1 9 抗体の構築

上記のように、ヒト化抗体可変領域アミノ酸配列が設計されると、シグナルペプチド、スプライス供与シグナルおよび適正な制限サイトを含むそれらのアミノ酸配列をコードするように遺伝子が構築された(図12および13)。重鎖可変領域遺伝子は、61から79塩基長の範囲の8つのオーバーラップする合成オリゴヌクレオチドを用いて構築、増幅した。オリゴを対にしてアニールし、DNAポリメラーゼのKlenow断片で伸長させ、4つの2本鎖断片を得た。得られた断片を変性し、アニールし、そしてKlenow断片で伸長して、2つの断片を得た。これらの断片を変性アニールし、そしてもう一度伸長させ全長の遺伝子を得た。得られた産物をTaqポリメラーゼを用いてポリメラーゼ鎖反応(PCR)により増幅し、ゲル精製し、XbaIで消化し、再度ゲル精製し、そしてpVg1(Co等、J. Immunol.、148:1149(1992))、またはpVg4発現ベクターのXbaIサイトへサブクローン化した。pVg4ベクターは、 $\gamma$ 4遺伝子のCH1エクソンの前のHindIIIサイトから該遺伝子のCH4エクソンの後のNsiIサイトの270塩基対後方に渡るヒト $\gamma$ 4定常領域遺伝子(Ellison and Hood、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、79巻、1984頁、1982年)の約2000塩基対の断片で、 $\gamma$ 1定常領域遺伝子を含むpVg1のXbaI-BamHI断片を置換することにより構築された。得られたプラスミドは、ヌクレオチド配列決定および制限酵素マッピングにより確認された。

軽鎖可変領域配列は以前構築されたgpIIb/IIIaに特異的なヒト化抗体



Hu C 4 G 1 に高度に相同であることが判明した。Hu C 4 G 1 軽鎖およびヒト化 F 9 1 9 軽鎖 (version 1) は、全可変領域中で位置 30、53、70 および 92 におけるわずかに 4 つのアミノ酸残基で異なる。それ故、我々は、合成オリグヌクレオチドおよび PCR を用いた部位特異的突然変異導入により、p V k プラスミド中に構築した Hu C 4 G 1 軽鎖遺伝子中へそれら 4 つの位置における望ましいアミノ酸残基を取り込むことによりヒト化 F 9 1 9 軽鎖可変領域遺伝子を構築した。2 番目のバージョンの軽鎖は位置 7 および 22 における 2 つの追加の変更を有し、そして同様に構築された。従って、得られたプラスミドはヒト C  $\kappa$  遺伝子を含む p V k ベクター中に各々のヒト化 F 9 1 9 可変領域遺伝子を含有する (前出の C o 等参照)。最終のプラスミドは、ヌクレオチド配列決定および制限酵素マッピングにより確認された。すべての操作は当業者に周知の標準的方法により実施された。

以上のように 4 つのヒト化 F 9 1 9 抗体が、下に示すように重鎖および軽鎖の異なる組合せにより構築された。

表 6

抗体名	重鎖	軽鎖
HuF919G1. v1	$\gamma$ 1	$\kappa$ version1
HuF919G1. v2	$\gamma$ 1	$\kappa$ version2
HuF919G4. v1	$\gamma$ 4	$\kappa$ version1
HuF919G4. v2	$\gamma$ 4	$\kappa$ version2

上述の各抗体を産生する細胞株を作製するため、各重鎖および軽鎖プラスミドをマウスミエローマ細胞株Sp2-0-ag14 (ATCC CRL1581) 中へトランスフェクトした。トランスフェクション前に重鎖および軽鎖含有プラスミドを各々BamHIおよびFspIを用いて直線化した。約20  $\mu$ gの各プラスミドをPBS中で $1 \times 10^7$  細胞中へトランスフェクトした。トランスフェクションはメーカーの指示に従って360 Vおよび25  $\mu$ FDのキャパシタンスでGene Pulser装置 (バイオラッド) を用いてエレクトロポレーションによりおこなった。各トランスフェクションからの細胞を4枚の96ウェルティッシュカルチャープレートに植込み、2日後、選択培地 (DMEM、10%FCS、1XHT supplement (シグマ)、0.25 mg/ml xanthine、1  $\mu$ g/ml mycophenolic acid) を添加した。

約2週間後、現れたクローンをELISAにより抗体産生についてスクリーニ

ングした。各トランスフェクションからの高産生クローンからの抗体は、細胞を標準培地（10% FCS/D-MEM）中でコンフルエントになるまで生育させ、次いで培地を無血清培地（Hybridoma SFM、GIBCO）に置き換え、そして培地中で最大の抗体価が得られるまで培養することにより調製した。培養上清をプロテインA-セファロースカラム（Pharmacia）に通し、抗体を0.1Mグリシン、0.1M NaCl（pH 3.0）で溶出し、続いてPBS中へ交換した。抗体の純度をアクリルアミドゲル上で分析することにより評価し、そして抗体濃度を、抗体蛋白質1.0mgは1.3のOD280値を有すると仮定して、OD280の値より決定した。

#### 10. ヒト化F919抗体の性状

マウスおよびヒト化F919抗体が抗原であるFasリガンドに結合することを示すため、25ngの各抗体（マウスF919、HuF919G1. V1、HuF919G1. V2、HuF919G4. V1およびHuF919G4. V2）を、ヒトFasリガンドを発現するようにマウスリンパ腫細胞株WR19Lをトランスフェクトした細胞である。1A12細胞とともに各々氷上で30分間インキュベートした。細胞を冷PBSで洗浄し、FITC標識ヤギ抗ヒトまたは抗マウス抗体（ダコ イムノロジカルズ）とともにさらに30分間インキュベートし、フローサイトメトリー（FACS）によって解析した。FACSヒストグラムから、マウスおよび4つのヒト化F919抗体は特異的に1A12細胞に結合し、トランスフェクトしていない細胞株WR19Lには結合しないことが示された。ヒト化F919抗体が受容体結合（Fasリガンド結合）に対してマウスF919抗体と競合する能力を調べるために、順次増加さ

せた量 ( $0.01 - 50 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) のマウス F919 抗体および各バージョンのヒト化 F919 抗体を各々、一定量 ( $5 \text{ ng}$ ) の  $^{125}\text{I}$  標識したトレーサーマウス抗体および  $5 \times 10^5$  個の 1A12 細胞とともに  $4^\circ\text{C}$  で 90 分間インキュベートした。マウスおよびヒト化 F919 抗体は実質的に等しい効率で競合した (図 14 および 15)。それらのデータから計算された各抗体の結合親和性は、下表 (表 7) に示されるようにほぼ同様であった。したがって、ヒト化操作は元の抗体の結合親和性を有意には減少させなかった。

表 7

抗体	親和性 ( $K_d$ )
Murine	$3 - 4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
HuF919G1. v1	$6 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
HuF919G1. v2	$4 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
HuF919G4. v1	$5 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$
HuF919G4. v2	$3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$

#### 11. ヒト化 F919 抗体のアポトーシス抑制活性の評価

1A12 細胞の WC8 細胞に対する細胞障害活性を抑制する活性を指標としてアポトーシス抑制活性を測定した。1A12 細胞はヒト Fas リガンドを発現するようにマウス WR19L 細胞を形質転換させた細胞であり (タナカ M. 等、Nature Medicine、2 巻、317-322 頁、1996 年)、ま

た、WC 8 細胞はヒト F a s 抗原を発現させるようにマウス WR 1 9 L 細胞を形質転換させた細胞である。この WR 1 9 L 細胞は、マウス F a s 抗原を殆ど発現せず、TNF の細胞障害作用に感受性の細胞である。細胞障害活性の測定は、ルービエ E. (R o u v i e r E. ) 等の方法に準じて行った (J. E x p. M e d. , 1 7 7 巻、1 9 5 - 2 0 0 頁、1 9 9 3 年)。先ず、1 A 1 2 細胞を 1 0 % 非働化ウシ胎児血清 (F B S) 含有 R P M I 1 6 4 0 で洗浄しエフェクター細胞として使用した。一方、1 0 0  $\mu$  l の 1 0 % 非働化 F B S 含有 R P M I 1 6 4 0 中で、2 0  $\mu$  C i の [ $^{51}$ Cr] クロム酸ナトリウム (N E N 社) と共に  $1 \times 10^6$  個の WC 8 を 3 7  $^{\circ}$ C で 2 時間インキュベートし、その後 1 0 % 非働化 F B S 含有 R P M I 1 6 4 0 で洗浄し、これらの細胞をターゲット細胞として使用した。

$1 \times 10^4$  個の 1 A 1 2 細胞とターゲット細胞  $1 \times 10^4$  個とを、様々な濃度のマウスまたはヒト化 F 9 1 9 抗体と共に全液量が計 1 0 0  $\mu$  l になるようにし 3 7  $^{\circ}$ C で 4 時間インキュベートした。 $\gamma$  カウンターによって測定した各ウェル中の上清の放射活性から、以下に示す式を用いて特異的細胞溶解率を算出した。 $^{51}$ Cr の自然放出量は、培地のみでターゲット細胞をインキュベートすることにより決定し、一方、最大放出量は、ターゲット細胞に 0. 1 % となるように T r i t o n X - 1 0 0 を加えることにより決定した。

$$\text{特異的細胞溶解率 (\%)} = \frac{\text{実測の } ^{51}\text{Cr の放出量} - ^{51}\text{Cr の自然放出量}}{^{51}\text{Cr の最大放出量} - ^{51}\text{Cr の自然放出量}} \times 100$$

各ヒト化抗F 9 1 9抗体は、マウス抗F 9 1 9抗体とほぼ同等またはやや強いアポトーシス抑制活性を示した（図1 6および1 7）。

1 2. 2種類のモノクローナル抗体を用いたサンドイッチE I A系による血中F a sリガンド濃度の測定

ヒト血中F a sリガンド濃度を測定するため、2種類のモノクローナル抗体（F 9 1 8-2 0-2、F 9 1 9-9-1 8）を用いた2ステップサンドイッチE I A系を作製した。

（1）ポリパーオキシダーゼ標識抗体の調製

まず、P I E R C E社I n s t r u c t i o n s 2 6 1 0 1 Xに記載の方法に従い、2-Imino thiolane·HCl（Traut's reagent）を用いてモノクローナル抗体F 9 1 9-9-1 8にSH基を導入した。すなわち、抗体1 5 m g（1 5 m g/m l）をゲルろ過カラムNAP-1 0（ファルマシア社）を用いて0. 1 M NaCl、1 m M E D T Aを含む5 0 m M トリエタノールアミン·HCl（p H 8. 0）（以下TEAと記す）の緩衝液に交換した。得られた抗体9 m g（6 m g/m l）を1. 4 m gずつ容器に分注し、TEAで1 0 0 μ g/m lになるように溶解したTraut's reagentをそれぞれ抗体：Traut's reagentのモル比が1：5、1：1 0または、1：5 0となるように添加し、窒素置換した後室温で6 0分間反応させた。反応終了後反応液組成をNAP-5（ファルマシア社）を用いて0. 1 M NaCl、5 m M E D T Aを含む0. 1 Mリン酸緩衝液（p H 7. 0）に交換した。導入されたSH基の数を測定するためP I E R C E社I n s t r u c t i o n s 2 6 1 0 1 Xに記載の方法に従い、Ellman's

reagent (5, 5' -dithio-bis-2-nitrobenzoic acid) を用いて導入されたSH基の数を算出した。その結果、抗体1モル当たりのSH基の数は抗体:Trant's Reagent モル比1:5で1.4個、1:10で1.0個、1:50で1.3個であった。導入率が最も良かった抗体:Trant's Reagent モル比1:5の抗体を用いてポリパーオキシダーゼ (PolyPOD) 標識物を以下のようにして調製した。

PolyPOD (MH) (ベーリンガーマンハイム社) を精製水で5mg/mlになるように溶解し上記抗体200 $\mu$ g (1.67mg/ml) にそれぞれ抗体:PolyPODモル比が4:1、2:1または、1:1となるようにPolyPOD溶液を添加し30℃で1時間反応させた。反応液に5mM N-エチルマレイミドをそれぞれ10 $\mu$ l添加して反応を止め、0.45%NaClを含む0.076M リン酸緩衝液 (pH6.4) (以下PBSと記す) に4℃で一夜透析した。標識抗体濃度は280nmと403nmの吸光度を測定し、以下に示す式を用いて算出した。透析後の液量を測定し、半量の18%シュークロース/0.3%BSA/PBSを添加し-40℃で保存した。

標識抗体濃度 (mg/ml) =

$$10 \times A_{280} - (A_{403} \times 10 / 7.58 \times 10^4) \times 2.29 \times 10^4$$

## (2) F(ab')<sub>2</sub> 断片の調製

次に超高感度酵素免疫測定法、(石川榮治著学会出版センター, 1993

年) に記載の方法に従い、モノクローナル抗体 F 9 1 8 - 2 0 - 2 より F ( a b ' ) <sub>2</sub> を調製した。すなわち、抗体 1 0 m g ( 5 m g / m l ) を 0 . 1 M NaCl を含む 0 . 1 M 酢酸ナトリウム緩衝液 ( p H 4 . 2 ) に 4 ° C で一夜透析した。同じ緩衝液で溶解したブタ胃ペプシン ( シグマ社 ) を 4 0 μ l ( 0 . 4 m g ) を添加し 3 7 ° C で 2 4 時間反応した。反応液を氷冷しトリス ( ヒドロキシメチル ) アミノメタンで p H を 7 付近に戻し、PBS で平衡化したプロテイン A 結合ガラス樹脂カラム Prosep-A ( Bio Prosessing 社 ) にアプライし切断された F c 部分を除いた。結合しなかった通過液を回収し、PBS に 4 ° C で一夜透析し、これに最終濃度 0 . 0 5 % となるようにアジ化ナトリウムを添加し 4 ° C で保存した。F ( a b ' ) <sub>2</sub> の濃度は 2 8 0 n m の吸光度より算出した。

### ( 3 ) ヒト血清中の Fas リガンド値の測定

F 9 1 9 - 9 - 1 8 抗体を用いて血中の Fas リガンドを吸収した正常人血清を希釈剤として実施例 4 - 1 に記載の精製 Fas リガンド細胞外領域を 5 n g / m l から倍々希釈により希釈系列 ( 5 ~ 0 . 0 8 n g / m l ) を作製した。また、ブランク ( Fas リガンド 0 n g / m l ) には希釈剤を使用した。臨床症状との関連性を明らかにするため、表 8 のパネル血清 ( Boston Biomedical 社 ) 中の Fas リガンド濃度を以下のようにして測定した。



表 8

商品名	バイアル数	コード
Anti-HIV Seroconversion Panel	8	PRB909B
Hepatitis A Seroconversion Panel A	5	PHT901A
Hepatitis B Seroconversion Panel	6	PHM910A
Hepatitis C Seroconversion Panel	7	PHV902B

まず、PBSで $30\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したF918-20-2F (a b')<sub>2</sub>を $70\mu\text{l}$ /ウェルずつイムノプレート (Maxisorp、Nunc社) に分注し、 $45^\circ\text{C}$ で30分間処理し抗体を固相化させた。イオン交換水で5回洗浄後、 $0.1\%$  BSA/PBS  $200\mu\text{l}$ を添加し室温で30分間ブロッキングした。

プレートのブロッキング液を廃棄した後、希釈したFas リガンドの希釈系列または検体 $20\mu\text{l}$ を各ウェルに分注し、第一反应用緩衝液として $0.1\%$  Tween 20、 $0.9\%$  NaClを含む $0.076\text{M}$ リン酸緩衝液 (pH 6.4) を各ウェルに $80\mu\text{l}$ 添加した。 $37^\circ\text{C}$ で2時間反応させた後、 $0.005\%$  Tween 20を含む $0.9\%$  NaClで5回洗浄した。次に10

%ウサギ血清1%マウス血清を含む第一反応用緩衝液で $0.5 \mu\text{g/ml}$ に希釈した最も反応性の良かったPolyPOD標識抗体(4:1結合)を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 分注し $37^\circ\text{C}$ で1時間反応させた。 $0.005\%$  Tween 20を含む $0.9\%$  NaClで5回洗浄した後、イオン交換水で2回洗浄した。 $0.2 \text{mg/ml}$ のテトラメチルベンジジンと $0.01\%$ の過酸化水素を含む $0.16 \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 5.5)を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 添加し、遮光して室温で15分間反応させた。 $1 \text{N}$ 硫酸を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ 添加し、反応を停止し吸光度計により波長 $450 \text{nm}$ の吸光度を測定した。

図18は測定したFasリガンドの希釈系列により作製した標準曲線を示したものであり、これを用いて各検体中のFasリガンド濃度を算出した。図19から図22は各パネル血清の他の項目の測定値(Boston Biomedical社添付文書記載)とFasリガンド濃度の推移を経時的に示したものである。なお、A型肝炎、B型肝炎患者パネル血清のALT値はトランスアミナーゼGPT測定用体外診断用医薬品オートセラGPT-2(第一化学薬品)を用いて日立オートマチックアナライザー7070(日立製作所)により測定した。

HIVの初期感染が疑われる患者のパネル血清では感染初期にFasリガンド値の上昇が認められた(図19)。また、A型肝炎、C型肝炎患者のパネル血清は両者とも初期感染が疑われ、ALT値の上昇に伴ってFasリガンド濃度が上昇した(図20および22)。一方、B型肝炎患者も初期感染例と推定されたがALT値の変動は認めれず、またFasリガンド濃度も上昇しなかった(図21)。したがって、これらの疾患ではFasリガンドがその臨床症状と何らか

の関連性を持っていることが示唆された。このことはF a s / F a s リガンド系が症状の悪化に関与していることを示すものであり、アポトーシスを抑制する抗F a s リガンド抗体がこれらの疾患で有効である可能性を示している。

## 産業上の利用可能性

本発明の抗F a s リガンド抗体を用いたヒト体液中のF a s リガンドの測定方法及び該測定方法に使用しうる抗体は、F a s リガンドの関与が示唆されている種々の疾患におけるF a s リガンドの増加減少または異常を検出するために使用できるため、特定の疾患及び病態の予知、検出および診断または治療方法の選択のために応用しうる。またF a s リガンド及びF a s リガンド関連物質ならびにF a s リガンドの発現に影響を与える薬剤による治療を受けている患者のモニタリング及び治療効果および予後の判定にも有用である。

F a s リガンドの作用を調節する抗体は、それを使用して、内因性または外因性のF a s リガンドにより生体内で生じるアポトーシスを調節し、疾患の治療や、診断に使用する事ができる。エイズウイルス感染後期の免疫能の低下や、劇症肝炎における肝機能低下は、免疫担当細胞あるいは肝細胞のアポトーシスにより組織の機能が著しく低下した結果と考えられる。このような状態においては、F a s リガンドの作用を抑制し、細胞のアポトーシスを防ぐことが必要になる。したがって、このような病態には、F a s リガンドの作用を抑制する抗F a s リガンド抗体を治療に使用することができる。また、心筋梗塞時の再灌流傷害、臓器移植、移植片対宿主病（GVHD）、潰瘍性大腸炎およびクローン病等のF a s リガンド／F a s 抗原の関与が示唆されている疾患の予防または治療に有用と考えられる。特に、本発明の抗F a s リガンド中和抗体は、低濃度で強力にアポトーシスを抑制することから、生体内においても低用量で有効でかつ副作用を低率に押えうることが期待されるので、有効性および安全性ならびにコストの面からも有用性が高い。

ヒト化抗体は、ヒトの治療における使用のために、マウスに比べ、そしていくつかの場合にはキメラ抗体に比べ、少なくとも3つの潜在的な利点を有する。

1) エフェクター部分がヒトであるので、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用しうる（例えば、補体依存性細胞障害（CDC）又は抗体依存性細胞障害（ADCC）による、より効率的な標的細胞の破壊）。

2) ヒト免疫系は、ヒト化抗体のフレームワーク又はC領域を異物として認識せず、従って、このような注入された抗体に対する抗体応答は、全部が異物であるマウス抗体又は一部分が異物であるキメラ抗体より少ない。

3) 注入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも非常に短い、ヒト内での循環における半減期を有すると報告されている（ショー、D. ら、J. Immunol. 138: 4534-4538 (1987)）。注入されたヒト化抗体は、恐らく、自然に生じるヒト抗体の半減期とより近い半減期を有し、より小さい又はより少ない頻度の投与量を与えること可能とする。

一方、Fasリガンドによるアポトーシスを促進する抗Fasリガンド抗体は、生体にとって不必要な細胞を除去するために使用することが可能である。たとえば、先述したように、エイズウイルス感染細胞ではFas抗原が発現されているので、エイズウイルス感染初期においては、該抗Fasリガンド抗体を使用してFasリガンドによるアポトーシスを人工的に増強し、感染細胞を早期に除去する事により、エイズを治療する事が可能であろう。また、ある種の自己免疫疾患では、人為的にFas抗原を介したFasリガンドによるアポトーシスを促進させる事により、自己抗原反応性のT細胞の除去が可能になるであろう。また、モリモト H. (Morimoto H.) 等は、癌細胞にFas抗原

を介したアポトーシスを誘導する事によって、アドリマイシンやシスプラチンによる制癌効果が相乗的に増強されることを報告している (Cancer Res. , 53巻、2591-2596頁、1993年) ので、Fasリガンドによるアポトーシスを促進する抗Fasリガンド抗体は癌治療にも使用することができるであろう。

さらに、それ自体はFasリガンドによるアポトーシスに影響しない抗Fasリガンド抗体も、イムノトキシンのように他の物質を結合させることによって治療等に応用することが可能である。

また、Fasリガンド自体を、治療や研究に使用するためには、当該蛋白質を高純度で、大量に生産することが必要になるが、本発明の抗Fasリガンド抗体はFasリガンドの精製にも有用である。特に治療用の医薬として重要と考えられる活性を保持したFasリガンドを特異的にかつ効率よく精製することができる。

## 配列表

配列番号 : 1

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 生物名 : ヒト

配列 :

Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly His Pro Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys

1

5

10

15

Glu Leu Arg Lys

20

配列番号 : 2

配列の長さ : 14

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 生物名 : ヒト

配列 :

Leu Thr Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp

1

5

10

配列番号 : 3

配列の長さ : 13

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 生物名 : ヒト

配列 :

Trp Glu Asp Thr Tyr Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val

1

5

10

配列番号 : 4

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 生物名 : ヒト

配列 :

Leu Val Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val

1

5

10

配列番号 : 5

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質



起源 生物名 : ヒト

配列 :

Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu

1

5

10

15

Pro Leu Ser His

配列番号 : 6

配列の長さ : 18

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 生物名 : ヒト

配列 :

Lys Val Tyr Met Arg Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met

1

5

10

15

Met Glu Gly

配列番号 : 7

配列の長さ : 16

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

起源 生物名 : ヒト

配列：

Lys Met Met Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser

1

5

10

15

Ser

配列番号：8

配列の長さ：11

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

起源 生物名：ヒト

配列：

Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe

1

5

10

配列番号：9

配列の長さ：179

配列の型：アミノ酸

配列の種類：タンパク質

起源 生物名：ヒト

配列：

Gln Leu Phe His Leu Gln Lys Glu Leu Ala Glu Leu Arg Glu Ser Thr

1

5

10

15

Ser Gln Met His Thr Ala Ser Ser Leu Glu Lys Gln Ile Gly His Pro  
20 25 30

Ser Pro Pro Pro Glu Lys Lys Glu Leu Arg Lys Val Ala His Leu Thr  
35 40 45

Gly Lys Ser Asn Ser Arg Ser Met Pro Leu Glu Trp Glu Asp Thr Tyr  
50 55 60

Gly Ile Val Leu Leu Ser Gly Val Lys Tyr Lys Lys Gly Gly Leu Val  
65 70 75 80

Ile Asn Glu Thr Gly Leu Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Val Tyr Phe Arg  
85 90 95

Gly Gln Ser Cys Asn Asn Leu Pro Leu Ser His Lys Val Tyr Met Arg  
100 105 110

Asn Ser Lys Tyr Pro Gln Asp Leu Val Met Met Glu Gly Lys Met Met  
115 120 125

Ser Tyr Cys Thr Thr Gly Gln Met Trp Ala Arg Ser Ser Tyr Leu Gly  
130 135 140

Ala Val Phe Asn Leu Thr Ser Ala Asp His Leu Tyr Val Asn Val Ser  
145 150 155 160

Glu Leu Ser Leu Val Asn Phe Glu Glu Ser Gln Thr Phe Phe Gly Leu  
165 170 175

Tyr Lys Leu  
179

配列番号 : 1 0

配列の長さ : 2 3

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys

20

配列番号 : 1 1

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1 5 10

配列番号 : 1 2

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

配列番号 : 1 3

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1

5

配列番号 : 1 4

配列の長さ : 3 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser

1

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln Gly Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys

20

25

30

配列番号：1 5

配列の長さ：9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr

1

5

配列番号：1 6

配列の長さ：1 0

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列 :

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

1

5

10

配列番号 : 1 7

配列の長さ : 1 2 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met Met Ser Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln

1

5

10

15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser

20

25

30

Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp

35

40

45

Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val

50

55

60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser

65

70

75

80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Ser Leu Thr Ile Ser

85

90

95

Asn Leu Glu Gln Gly Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser

100

105

110

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

115

120

125

配列番号 : 1 8

配列の長さ : 3 0

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu

1

5

10

15

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

配列番号 : 1 9

配列の長さ : 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質



配列：

Glu Tyr Pro Met His

1

5

配列番号：20

配列の長さ：14

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe Lys Trp Met Gly

1

5

10

配列番号：21

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Ile Tyr Thr Asp Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Glu Glu Phe Lys

1

5

10

15

Gly

配列番号 : 2 2

配列の長さ : 3 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln

1

5

10

15

Ile Asn Phe Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg

20

25

30

配列番号 : 2 3

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Phe Tyr Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr

1

5

配列番号 : 2 4

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1

5

10

配列番号 : 2 5

配列の長さ : 1 3 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met Asp Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Ile Ala Ala Ala Gln Ser

1

5

10

15

Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys

20

25

30

Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35

40

45

Thr Glu Tyr Pro Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Phe  
50 55 60  
Lys Trp Met Gly Met Ile Tyr Thr Asp Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala  
65 70 75 80  
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser  
85 90 95  
Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn Phe Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr  
100 105 110  
Tyr Phe Cys Val Arg Phe Tyr Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
115 120 125  
Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
130 135

配列番号 : 2 6

配列の長さ : 2 3

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys

20

配列番号 : 2 7

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn

1

5

10

配列番号 : 2 8

配列の長さ : 1 5

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

配列番号 : 2 9

配列の長さ : 7

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser

1

5

配列番号 : 3 0

配列の長さ : 3 2

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Thr

1

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys

20

25

30

配列番号 : 3 1

配列の長さ : 9

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Gln Gly Ser Thr Leu Pro Trp Thr

1

5

配列番号：3 2

配列の長さ：1 0

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys

1

5

10

配列番号：3 3

配列の長さ：1 2 7

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro  
1 5 10 15  
Gly Ser Thr Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser  
20 25 30  
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp  
35 40 45  
Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro  
50 55 60  
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser  
65 70 75 80  
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asn Tyr Thr Leu Thr Ile Ser  
85 90 95  
Ser Leu Gln Pro Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Ser  
100 105 110  
Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys  
115 120 125

配列番号： 3 4

配列の長さ : 3 0

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状



配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1

5

10

15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr

20

25

30

配列番号：3 5

配列の長さ：5

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Glu Tyr Pro Met His

1

5

配列番号：3 6

配列の長さ：1 4

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe Lys Trp Met Gly

1

5

10

配列番号：37

配列の長さ：17

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Met Ile Tyr Thr Asp Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala Glu Glu Phe Lys

1

5

10

15

Gly

配列番号：38

配列の長さ：32

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr Met Glu

1

5

10

15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg

20

25

30

配列番号 : 3 9

配列の長さ : 8

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Phe Tyr Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr

1

5

配列番号 : 4 0

配列の長さ : 1 1

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

配列番号 : 4 1

配列の長さ : 1 3 6

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : タンパク質

配列 :

Met Asp Trp Val Trp Thr Leu Leu Phe Leu Ile Ala Ala Ala Gln Ser  
1 5 10 15  
Ala Gln Ala Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
20 25 30  
Pro Gly Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
35 40 45  
Thr Glu Tyr Pro Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Phe  
50 55 60  
Lys Trp Met Gly Met Ile Tyr Thr Asp Thr Gly Glu Pro Ser Tyr Ala  
65 70 75 80  
Glu Glu Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Thr Leu Asp Thr Ser Thr Asn  
85 90 95  
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
100 105 110  
Tyr Tyr Cys Val Arg Phe Tyr Trp Asp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln  
115 120 125

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

130

135

## 請求の範囲

1. Fas リガンドによる Fas 抗原発現細胞のアポトーシスを少なくとも 50%以上抑制する中和抗体であることを特徴とする抗 Fas リガンド抗体。
2. Fas リガンドによる Fas 抗原発現細胞のアポトーシスを  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$  で少なくとも 50%以上抑制する中和抗体であることを特徴とする請求項 1 に記載の抗 Fas リガンド抗体。
3. アポトーシス誘導活性を有する Fas リガンドと反応し、アポトーシス誘導活性を有しない Fas リガンドとは反応しない中和抗体であることを特徴とする抗 Fas リガンド抗体。
4. 少なくとも  $10^7 \text{ M}^{-1}$  の親和定数でヒト Fas リガンドに結合する中和抗体である、請求項 1 ないし 3 のいずれかに記載の抗 Fas リガンド抗体。
5. 配列表の配列番号 11、13、15、19、21 および 23 のアミノ酸配列を有する相補性決定領域 (CDR) の内の少なくとも一つを含有する中和抗体である、請求項 1 ないし 4 のいずれかに記載の抗 Fas リガンド抗体。
6. 配列表の配列番号 1 ないし 8 のアミノ酸配列よりなるペプチドのいずれか 1 つと特異的に反応することを特徴とする抗 Fas リガンド抗体。
7. 配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列よりなるペプチドと特異的に反応し、配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 3 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 4 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 5 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 6 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 7 のアミノ酸配列よりな

るペプチドおよび配列表の配列番号 8 のアミノ酸配列よりなるペプチドとは反応しない請求項 6 に記載の抗 Fas リガンド抗体。

8. 配列表の配列番号 6 のアミノ酸配列よりなるペプチドと特異的に反応し、配列表の配列番号 1 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 2 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 3 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 4 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 5 のアミノ酸配列よりなるペプチド、配列表の配列番号 7 のアミノ酸配列よりなるペプチドおよび配列表の配列番号 8 のアミノ酸配列よりなるペプチドとは反応しない請求項 6 に記載の抗 Fas リガンド抗体。

9. ヒト Fas リガンドと特異的に結合する非ヒト供与体（ドナー）免疫グロブリン（Ig）からの CDR およびヒト受容体（アクセプター）フレームワーク領域（FR）を含有するヒト化 Ig である抗 Fas リガンド抗体。

10. ヒト Fas リガンドと特異的に結合する非ヒト供与体（ドナー）免疫グロブリン（Ig）からの CDR およびヒト受容体（アクセプター）フレームワーク領域（FR）を含有するヒト化 Ig である、請求項 1 ないし 8 のいずれかに記載の抗 Fas リガンド抗体。

11. Fas リガンドによる Fas 抗原発現細胞のアポトーシスを抑制する中和抗体であることを特徴とする請求項 9 または 10 に記載の抗 Fas リガンド抗体。

12. 前記ヒト化免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークのアミノ酸配列が、供与体免疫グロブリン重鎖可変領域フレームワークのアミノ酸配列に対して 65% 以上 95% 以下の相同性である、請求項 9 ないし 11 のいずれかに記載の

抗F a s リガンド抗体。

13. 受容体免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列が、供与体免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列に最も相同であるヒト免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列の代表的なコレクション (collection) 中の5配列のうちの一つである、請求項9ないし12のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体。

14. 前記ヒト化免疫グロブリンが、受容体免疫グロブリン重鎖又は軽鎖フレームワーク中の対応するアミノ酸と置き換わる、供与体免疫グロブリンフレームワーク由来のアミノ酸を含み、かつ、該アミノ酸のそれぞれが、

(1) 供与体免疫グロブリン配列中のCDRに1次配列上近接している、又は

(2) 該供与体もしくはヒト化免疫グロブリン中のCDRから5オングストローム以内の距離にある原子を含む、

ことを特徴とする、請求項9ないし13のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体。

15. 抗F a s リガンド抗体を用いてヒト体液中のF a s リガンドを測定することを特徴とするF a s リガンドの測定方法。

16. 少なくとも請求項1ないし8のいずれかに記載の抗F a s リガンド抗体を用いてF a s リガンドを測定することを特徴とするF a s リガンドの測定方法。

17. ヒト体液中のF a s リガンド量の増加または減少を測定し、F a s 抗原／F a s リガンド系の機能異常、それらを伴う疾患または該疾患に付随する病態の予知、検出または診断に用いる請求項15または16に記載のF a s リガンド



の測定方法。

18. 前記疾患がB型肝炎、C型肝炎およびHIV感染症より選ばれる少なくとも1つの疾患である請求項17に記載の測定方法。

19. 前記測定方法が、サンドイッチ法による請求項15ないし17のいずれかに記載の測定方法。

20. 前記Fasリガンド抗体が少なくとも請求項1ないし8のいずれかに記載の抗体である請求項15ないし19のいずれかに記載の測定方法。

21. 請求項1ないし5のいずれかに記載の同一のまたは異なる2種類以上の抗Fasリガンド中和抗体を組み合わせる請求項15ないし20のいずれかに記載の測定方法。

22. 請求項6ないし8のいずれかに記載の同一のまたは異なる2種類以上の抗Fasリガンド抗体を組み合わせる請求項15ないし20のいずれかに記載の測定方法。

23. 請求項1ないし5のいずれかに記載の抗Fasリガンド抗体および請求項6ないし8のいずれかに記載の抗Fasリガンド抗体を各々1種類以上を組み合わせる請求項15ないし20のいずれかに記載の測定方法。

24. 受託番号FERM BP-5535のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体F919-9-18および配列表の配列番号1のペプチドと特異的に反応するモノクローナル抗体を組み合わせる請求項21に記載の測定方法。

25. 請求項1ないし14のいずれかに記載の抗体を産生するハイブリドーマまたは細胞株。

26. 前記ハイブリドーマが、受託番号FERM BP-5533、FERM BP-5534またはFERM BP-5535である請求項25に記載のハイブリドーマ。

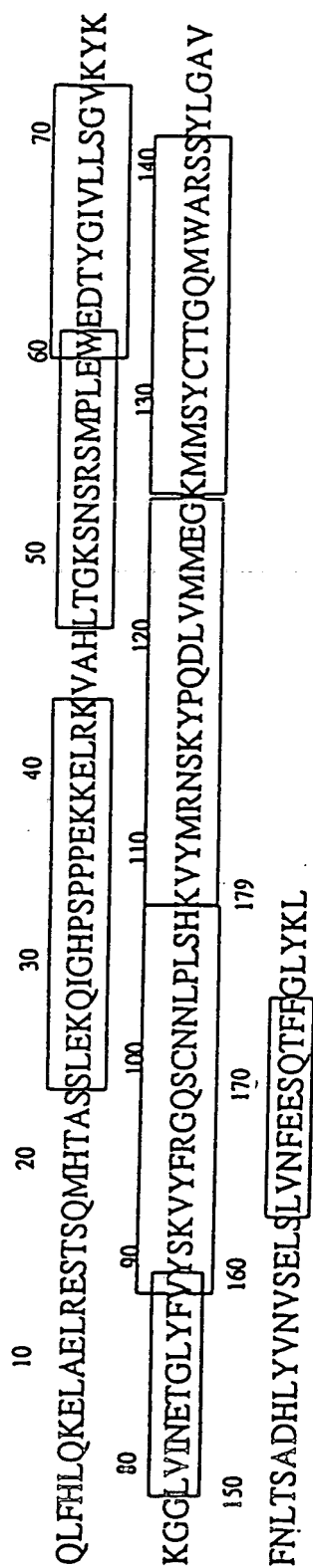
27. 請求項1ないし14のいずれかに記載の抗Fasリガンド抗体を有効成分として含有する組成物。

28. Fas抗原/Fasリガンド系の異常もしくはFas抗原を介するアポトーシスの異常を伴う、該異常により引き起こされるまたは該異常の関与する、全身性または局所性の病的状態または疾患を処置するための方法であって、FasリガンドによるFas抗原発現細胞のアポトーシスを抑制する抗Fasリガンド抗体の治療有効量を患者に投与することを含む方法。

29. 請求項1ないし14のいずれかに記載の抗Fasリガンド抗体を含有することを特徴とするヒト体液中のFasリガンド量を測定するための試薬またはキット。

30. 抗Fasリガンド抗体を必須の成分として含有することを特徴とする、請求項15ないし21のいずれかに記載の方法によりヒト体液中のFasリガンド量を測定するための試薬またはキット。

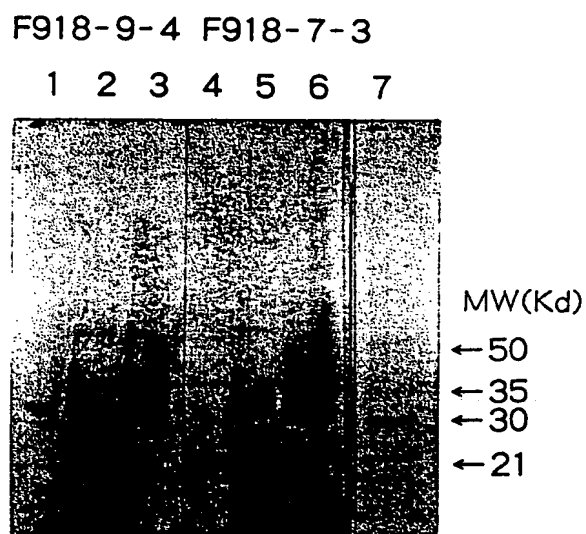
Fig. 1



ペプチド番号	アミノ酸配列
M52	SLEKQIGHSPPPPEKKELRK
M53	LTGKSNRSRSMPLW
M54	WEDTYGIVLLSGV
M55	LVINETGLYFV
M56	VYSKVYFRGQSCNNPLSH
M57	KVYMRNSKYPQDLVMMEG
M58	KMMSYCTTGQMWARS
M59	LVNFEESQTFE



Fig. 2



- 1, 4 : COS-1細胞由来遊離型F a s リガンド
- 2, 5 : COS-1細胞由来F a s リガンド細胞外領域
- 3, 6 : Pichia酵母由来F a s リガンド細胞外領域
- 7 : 分子量マーカー



Fig. 3

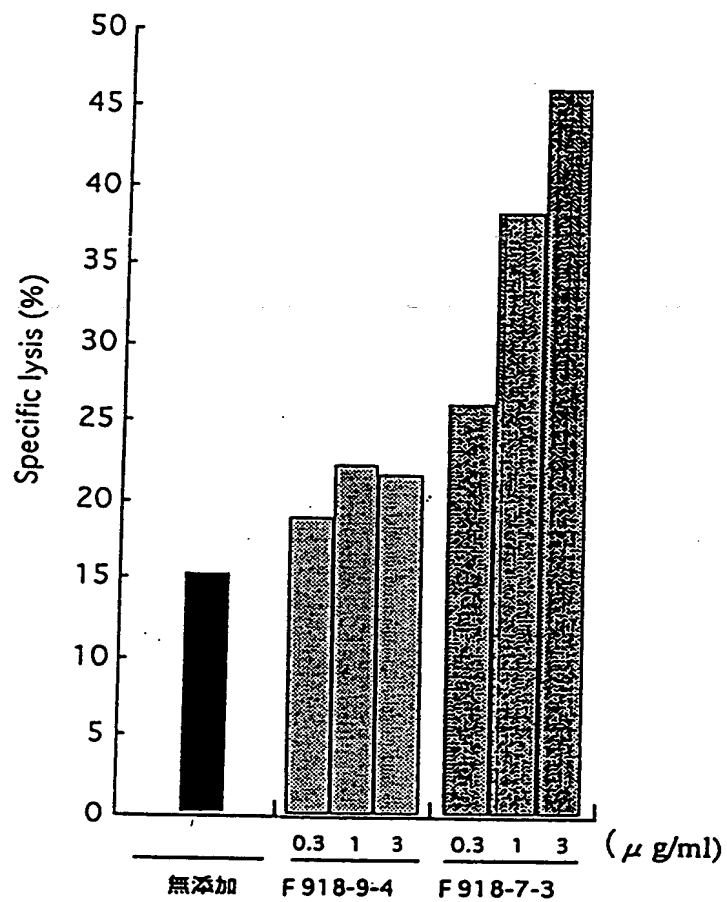






Fig. 4

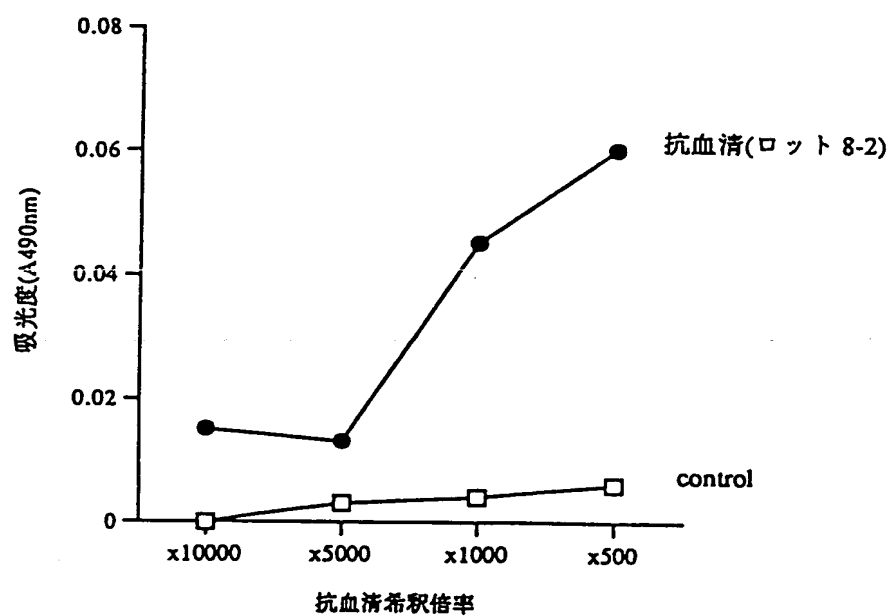




Fig. 5

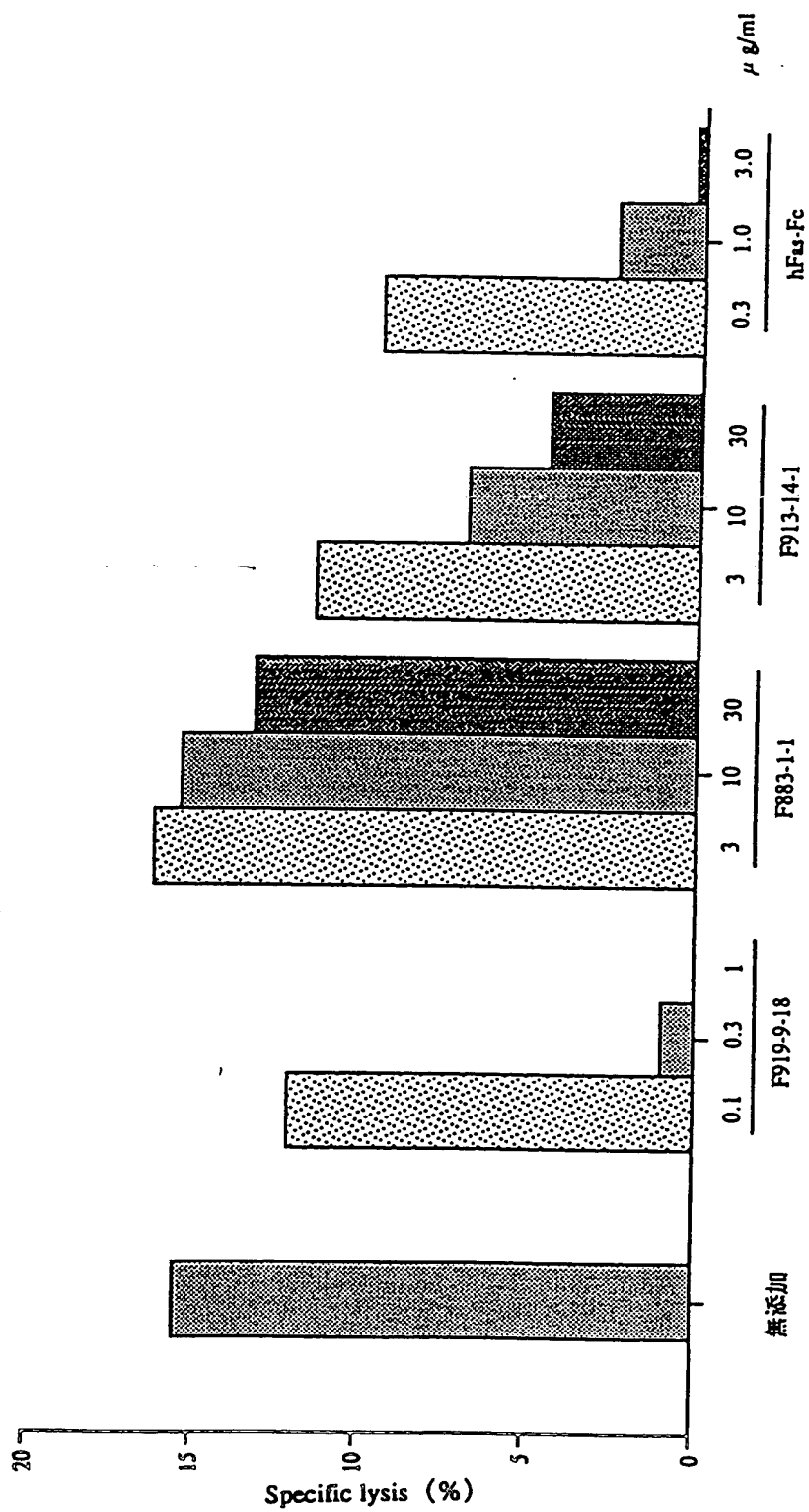




Fig. 6

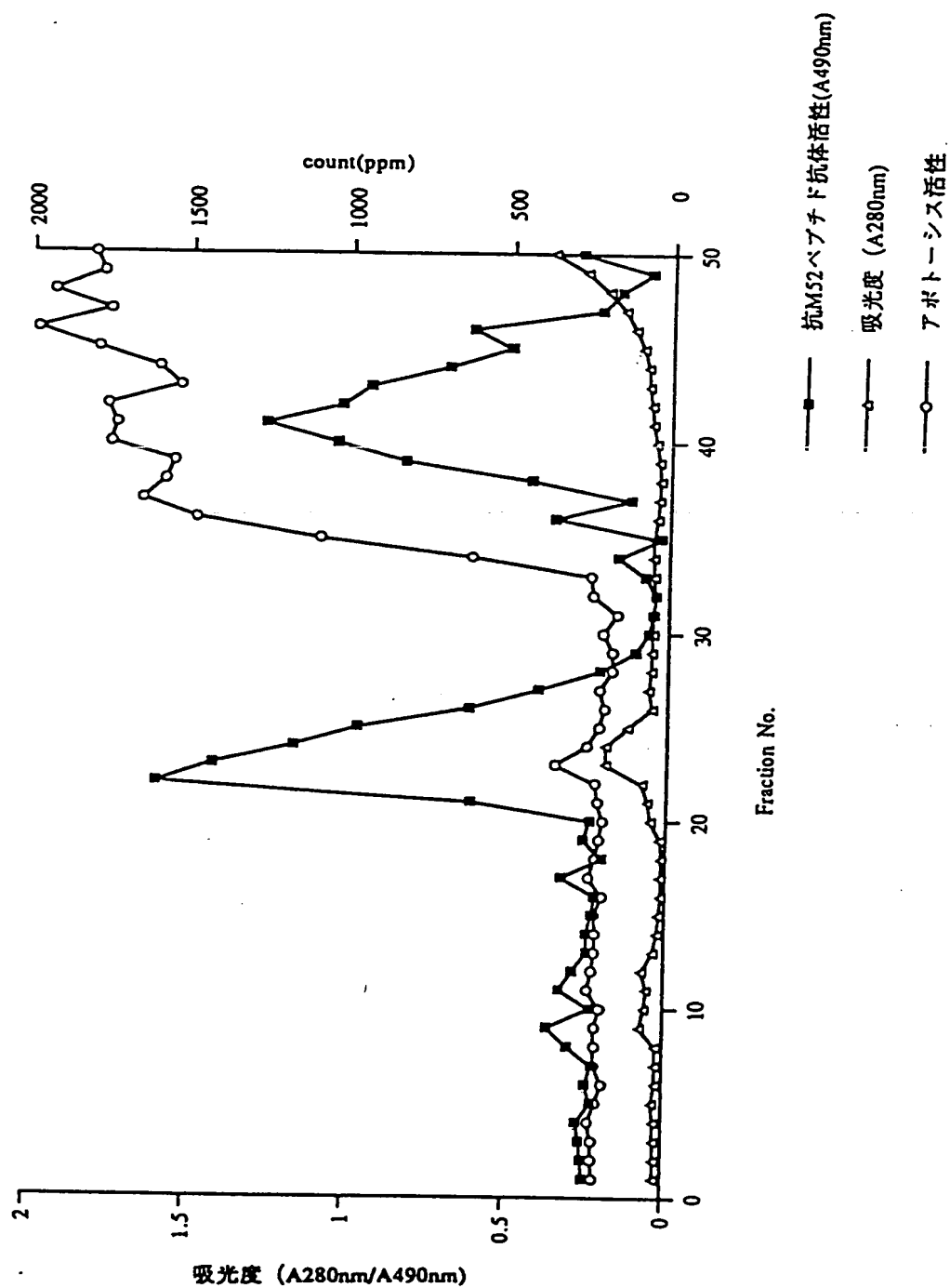
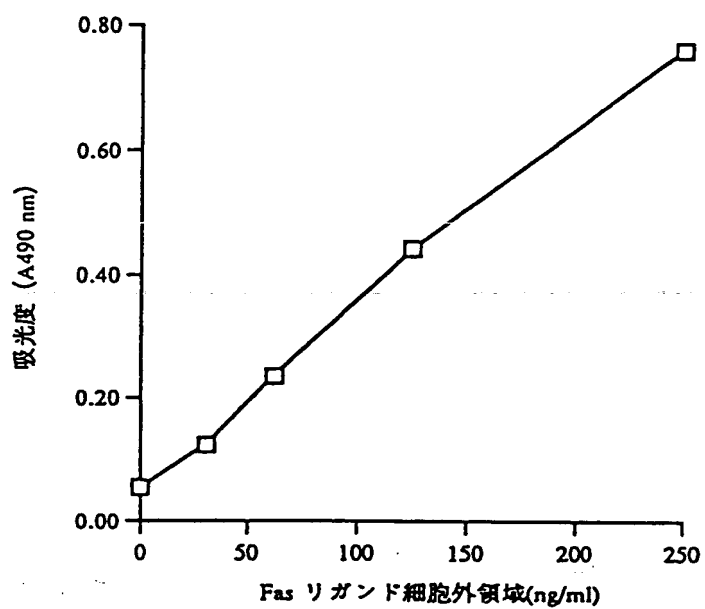




Fig. 7



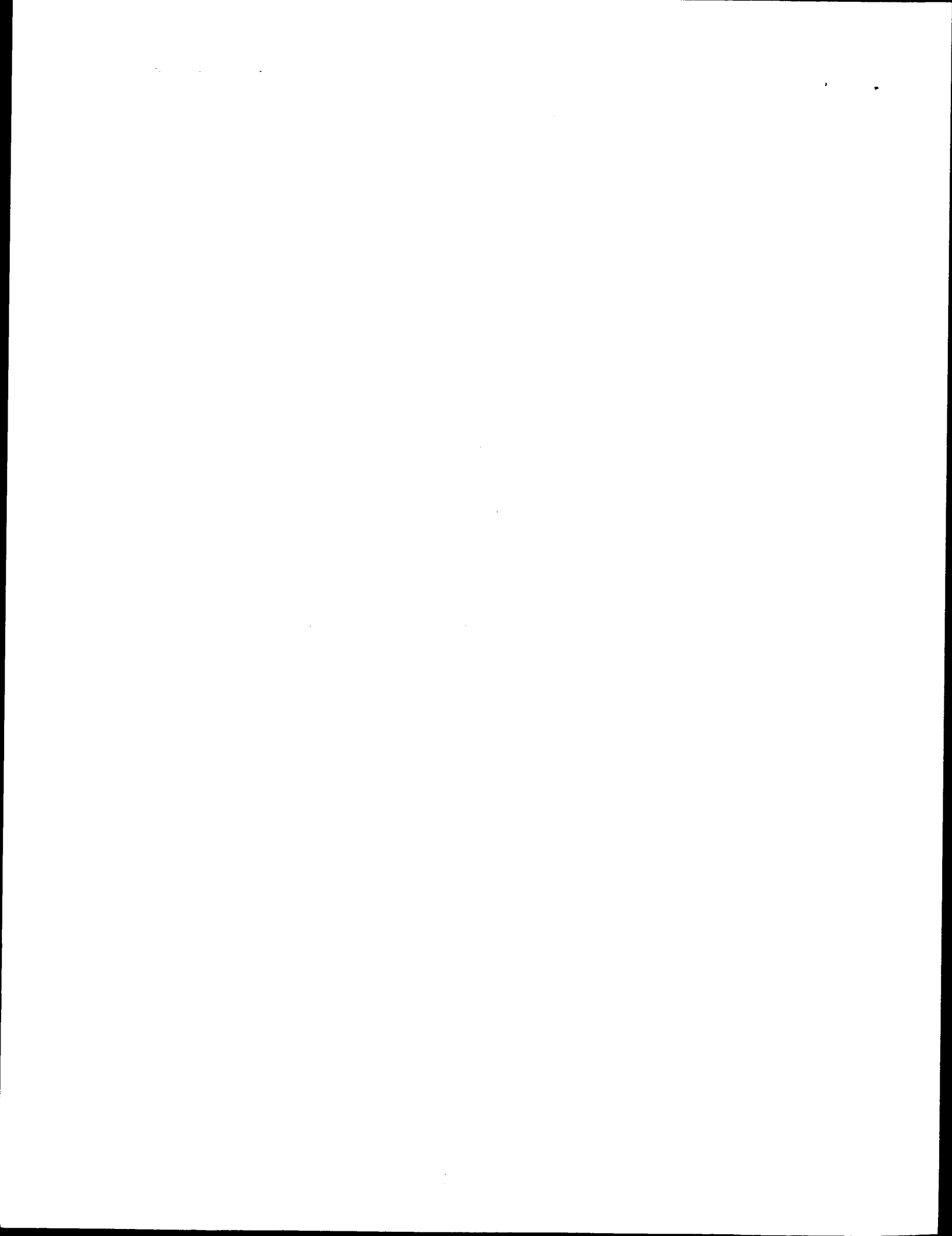




Fig. 8

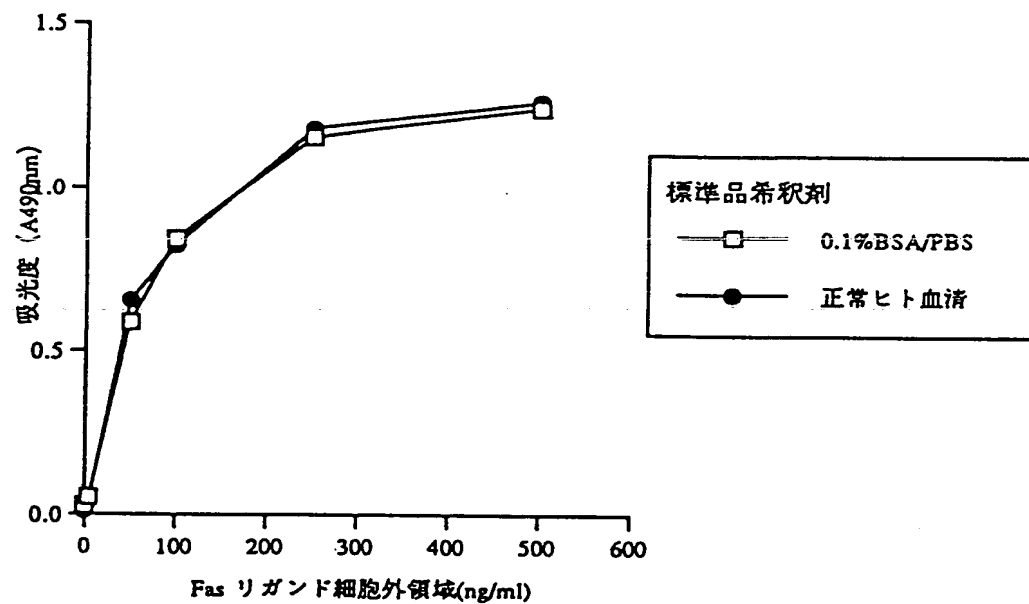




Figure 1 is a scatter plot showing Fas ligand levels (ng/ml) on the y-axis (logarithmic scale, 0 to 30) across four groups on the x-axis: 正常人 (Normal), B型肝炎 (B-type hepatitis), C型肝炎 (C-type hepatitis), and HIV抗体陽性 (HIV antibody positive). The sample sizes for each group are indicated in parentheses below the x-axis labels: (0/26) for Normal, (9/36) for B-type hepatitis, (4/13) for C-type hepatitis, and (1/14) for HIV antibody positive. The plot shows that Fas ligand levels are generally low in the normal group and increase in the hepatitis and HIV groups.

Group	Sample Size	Fas Ligand Levels (ng/ml)
正常人	(0/26)	~0.5
B型肝炎	(9/36)	~0.5, ~1.5, ~2.5, ~3.5, ~4.5, ~5.5, ~6.5, ~7.5, ~8.5
C型肝炎	(4/13)	~1.5, ~2.5, ~3.5, ~4.5
HIV抗体陽性	(1/14)	~5.5



FIG. 10

30 60  
ATG ATG TOC TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA GGT ACC AGA TGT  
M M S S A Q F L G L L L L C F Q G T R C

90 120  
GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TOC TOC CTG TCT GGC TCT CTG GGA GAC AGA GTC ACC  
D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T

150 180  
ATC AGT TGC AGG GGC AGT CAG GAC ATT AGC AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA OCA  
I S C R A S O D I S N Y L N W Y Q Q K P

210 240  
GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC OCA TCA  
D G T V K L L I Y Y T S R L H S G V P S

270 300  
AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA AAT TAT TCT CTC ACC ATT AGC AAC CTG GAA CAA  
R F S G S G S G T N Y S L T I S N L E Q

330 360  
GGA GAT ATT GGC ACT TAC TTT TGC CAA CAG GGT AGT AOG CTT COG TGG AOG TTC GGT GGA  
G D I A T Y F C Q O G S T L P W T F G G

GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA  
G T K L E I K

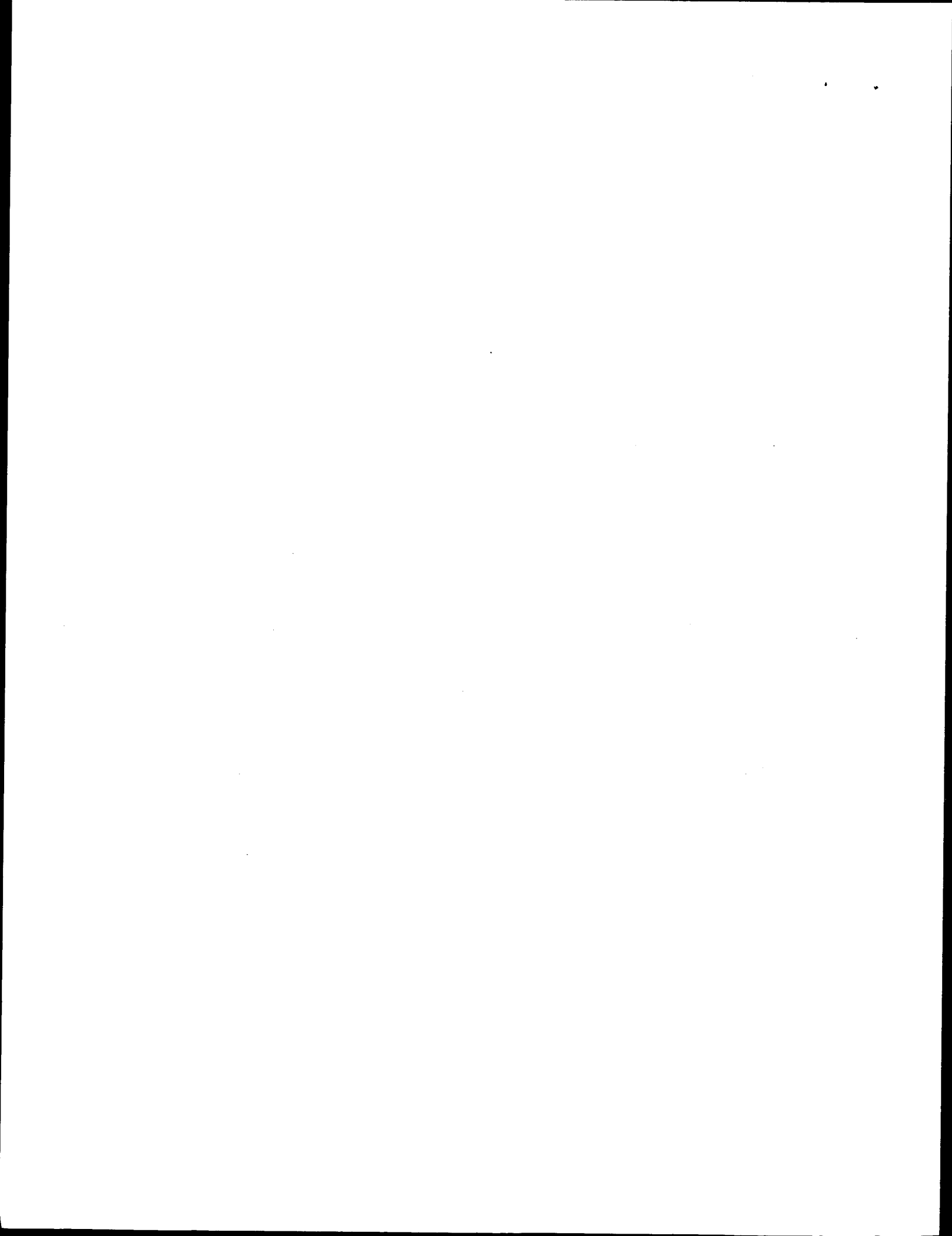


FIG. 11

30 60  
ATG GAT TGG GTG TGG AOC TTG CTA TTC CTG ATA GCA GCT GOC CAA AGT GOC CAA GCA CAG  
M D W V W T L L F L I A A A Q S A Q A Q

90 120  
ATC CAG TTG GTG CAG TCT GGA OCT GAG CTG AAG AAG OCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC TOC  
I Q L V Q S G P E L K K P G E T V K I S

150 180  
TGC AAG GCT TCT GGG TAT AOC TTC ACA GAA TAT OCA ATG CAC TGG GTG AAG CAG GCT OCA  
C K A S G Y T F T E Y P M H W V K Q A P

210 240  
GGA AAG GGT TTC AAG TGG ATG GGC ATG ATA TAC AOC GAC ACT GGA GAG OCA TCA TAT GCT  
G K G F K W M G M I Y T D T G E P S Y A

270 300  
GAA GAG TTC AAG GGG OGG TTT GOC TTC TCT TTG GAG AOC TCT GOC AGC ACT GOC TAT TTG  
E E F K G R F A F S L E T S A S T A Y L

330 360  
CAG ATC AAC TTC CTC AAA AAT GAG GAC AOC GCT ACA TAT TTC TGT GTA AGA TTT TAC TGG  
Q I N F L K N E D T A T Y F C V R F Y W

390  
GAT TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGC AOC ACT CTC ACA GTC TOC TCA  
D Y F D Y W G Q G T T L T V S S





FIG. 12

30 60  
 ATG GAG ACC GAT ACC CTC CTG CTA TGG GTC CTC CTG CTA TGG GTC OCA GGA TCA ACC GGA  
 M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

90 120  
 GAT ATT CAG ATG ACC CAG AGT OCG TOG ACC CTC TCT GCT AGC GTC GGG GAT AGG GTC ACC  
D I Q M T Q S P S T L S A S V G D R V T

150 180  
 ATA ACT TGC AGG GCA AGT CAG GAC ATT TOG AAT TAT TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAG OCA  
 I T C R A S O D I S N Y L N W Y Q Q K P

210 240  
 GGC AAA GCT CCG AAG CTT CTA ATT TAT TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGG GTA OCT TCA  
 G K A P K L L I Y Y T S R L H S G V P S

240 270  
 OGC TTC AGT GGC AGT GGA TCT GGG ACC AAT TAT ACC CTC ACA ATC TOG AGT CTG CAG OCA  
 R F S G S G S G T N Y T L T I S S L Q P

330 360  
 GAT GAT TTC GGC ACT TAT TTT TGC CAA CAG GGT AGT ACG CTT CCG TGG ACG TTC GGT CAG  
 D D F A T Y F C Q O G S T L P W T F G Q

GGG ACC AAG GTG GAG GTC AAA  
 G T K V E V K



FIG. 13

30 60  
 ATG GAT TGG GTG TGG AOC TTG CTA TTC CTG ATA GCT GCA GOC CAA AGT GOC CAA GCA CAG  
 M D W V W T L L F L I A A A Q S A Q A Q

90 120  
 GTC CAG TTG GTG CAG TCT GGA GCT GAG GTG AAG AAG OCT GGA AGC TCA GTC AAG GTG TOC  
 V Q L V Q S G A E V K K P G S S V K V S

150 180  
 TGC AAA GCT TCT GGG TAT AOC TTC ACA GAA TAT OCA ATG CAC TGG GTG AGA CAG GCT OCA  
 C K A S G Y T F T E Y P M H W V R Q A P

210 240  
 GGA CAG GGT TTC AAG TGG ATG GGC ATG ATA TAC AOC GAC ACT GGA GAG OCA TCA TAT GCT  
 G Q G F K W M G M I Y T D T G E P S Y A

270 300  
 GAA GAG TTC AAG GGA OGG TTT ACA TTC ACT TTG GAC AOC TCT AOC AAC ACT GOC TAT ATG  
E E F K G R F T F T L D T S T N T A Y M

330 360  
 GAG CTC AGC TCT CTC AGG TCT, GAG GAC AOC GCT GTC TAT TAC TGT GTA AGA TTT TAC TGG  
 E L S S L R S E D T A V Y Y C V R F Y W

390  
 GAT TAC TTT GAC TAC TGG GGT CAA GGT AOC CTG GTC ACA GTC TOC TCA  
D Y F D Y W G Q G T L V T V S S



FIG. 14

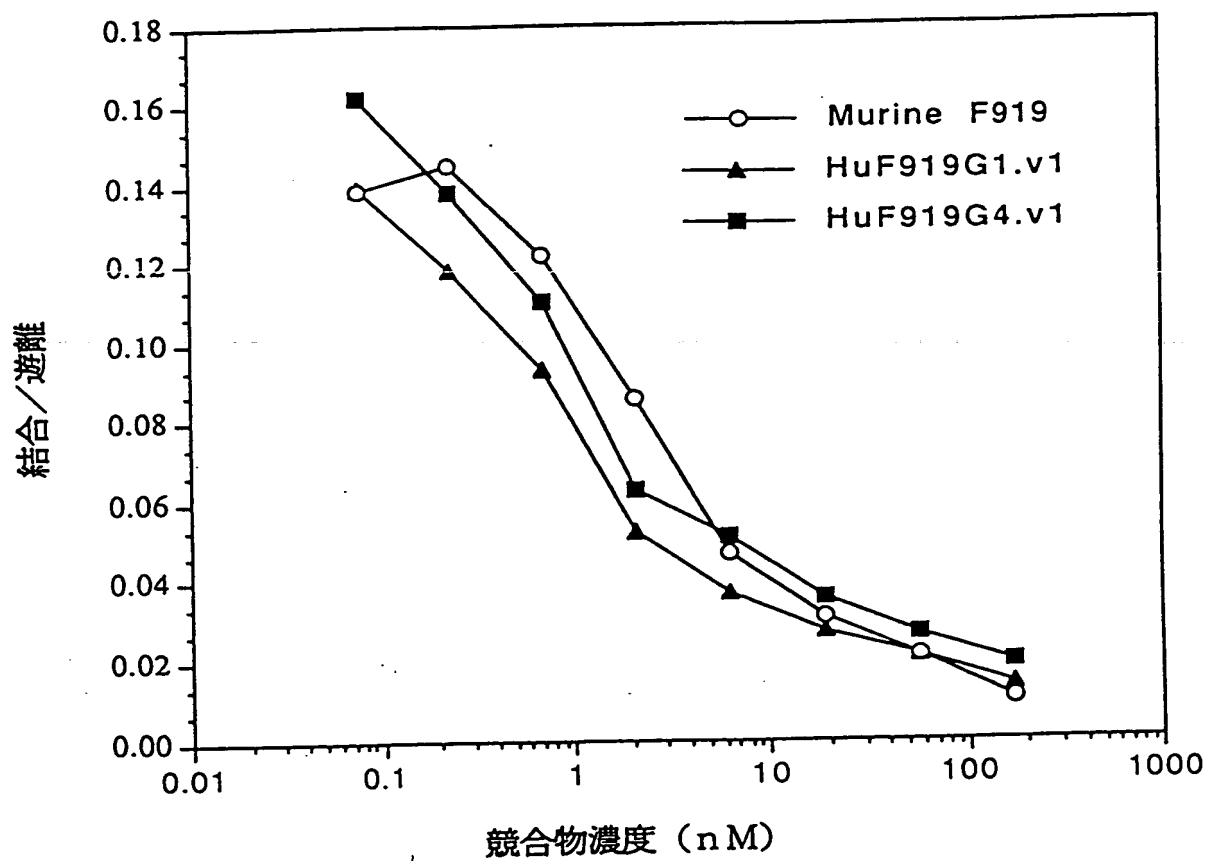




FIG. 15

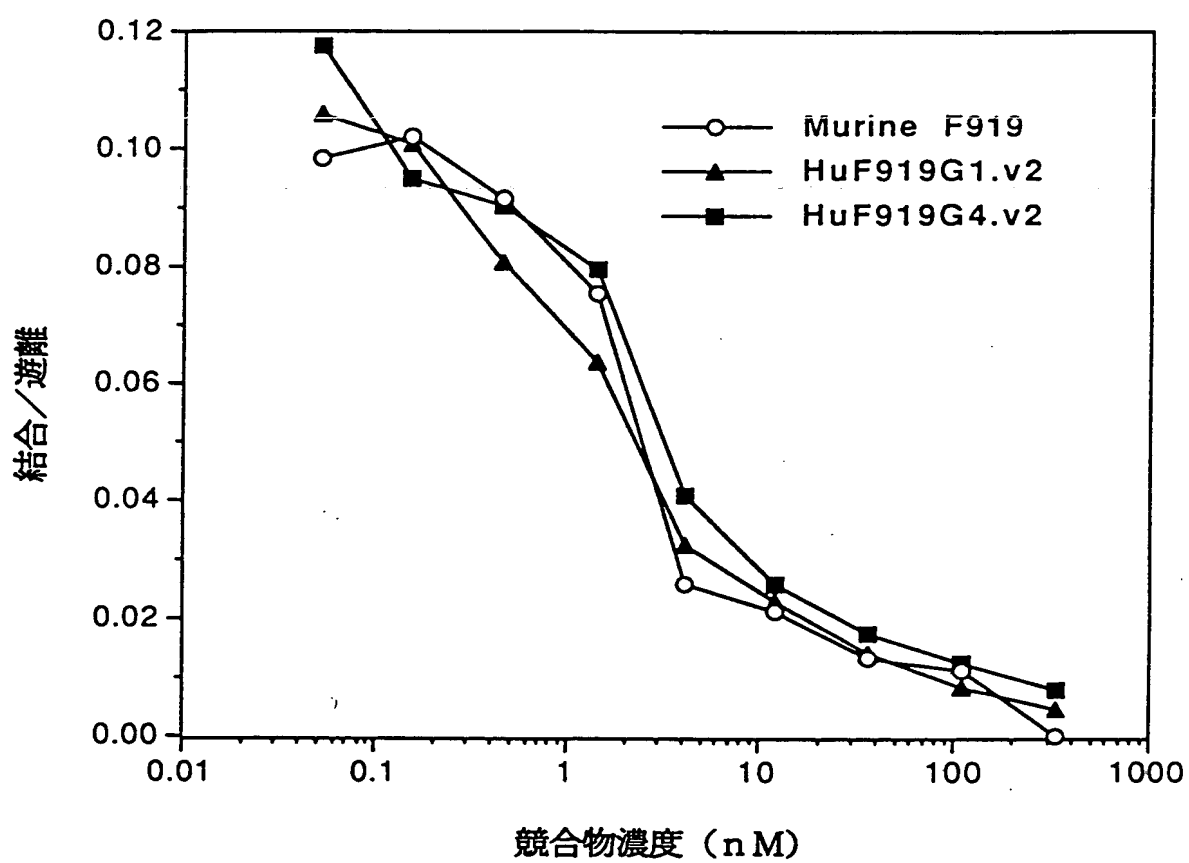






FIG. 16

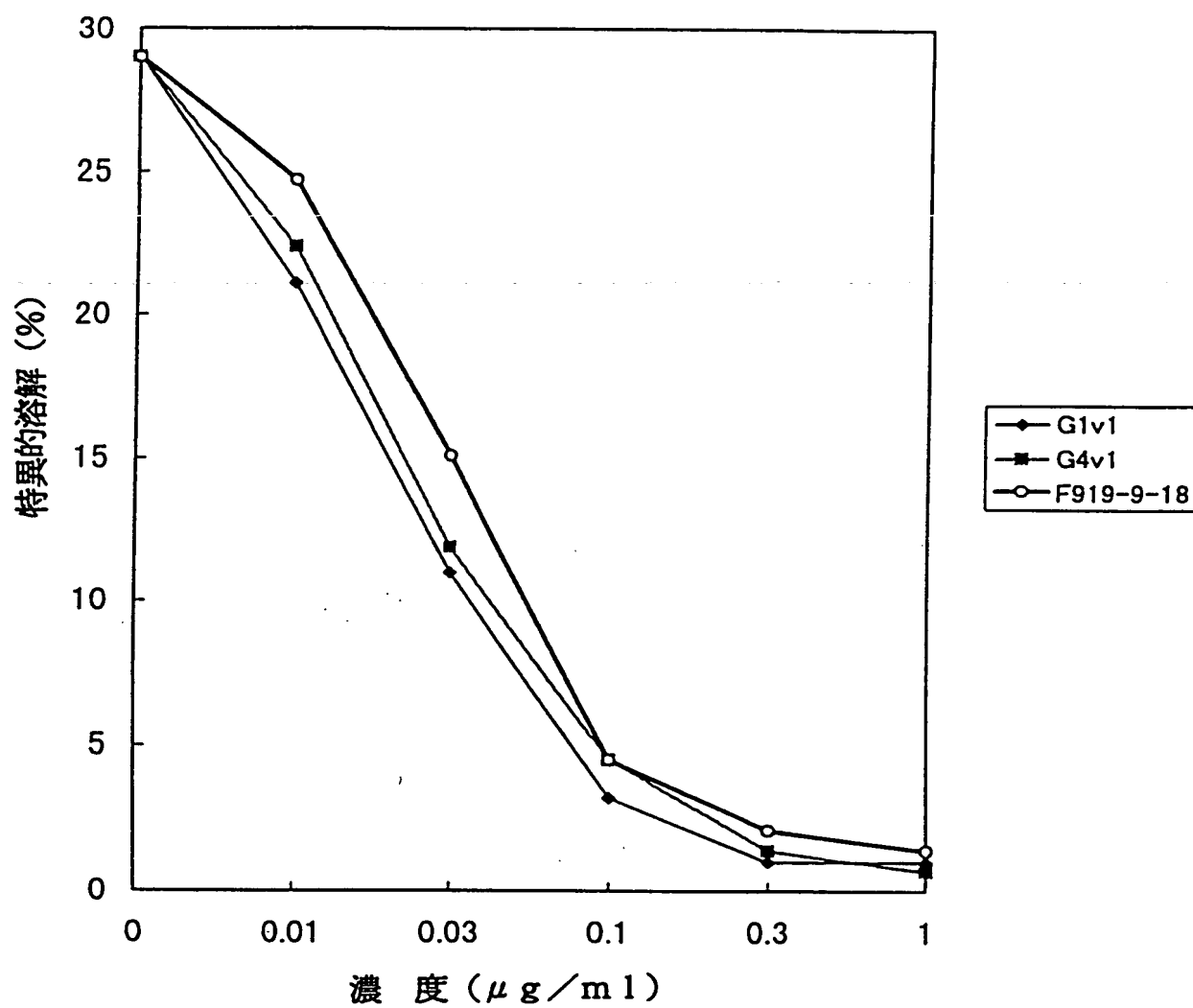




FIG. 17

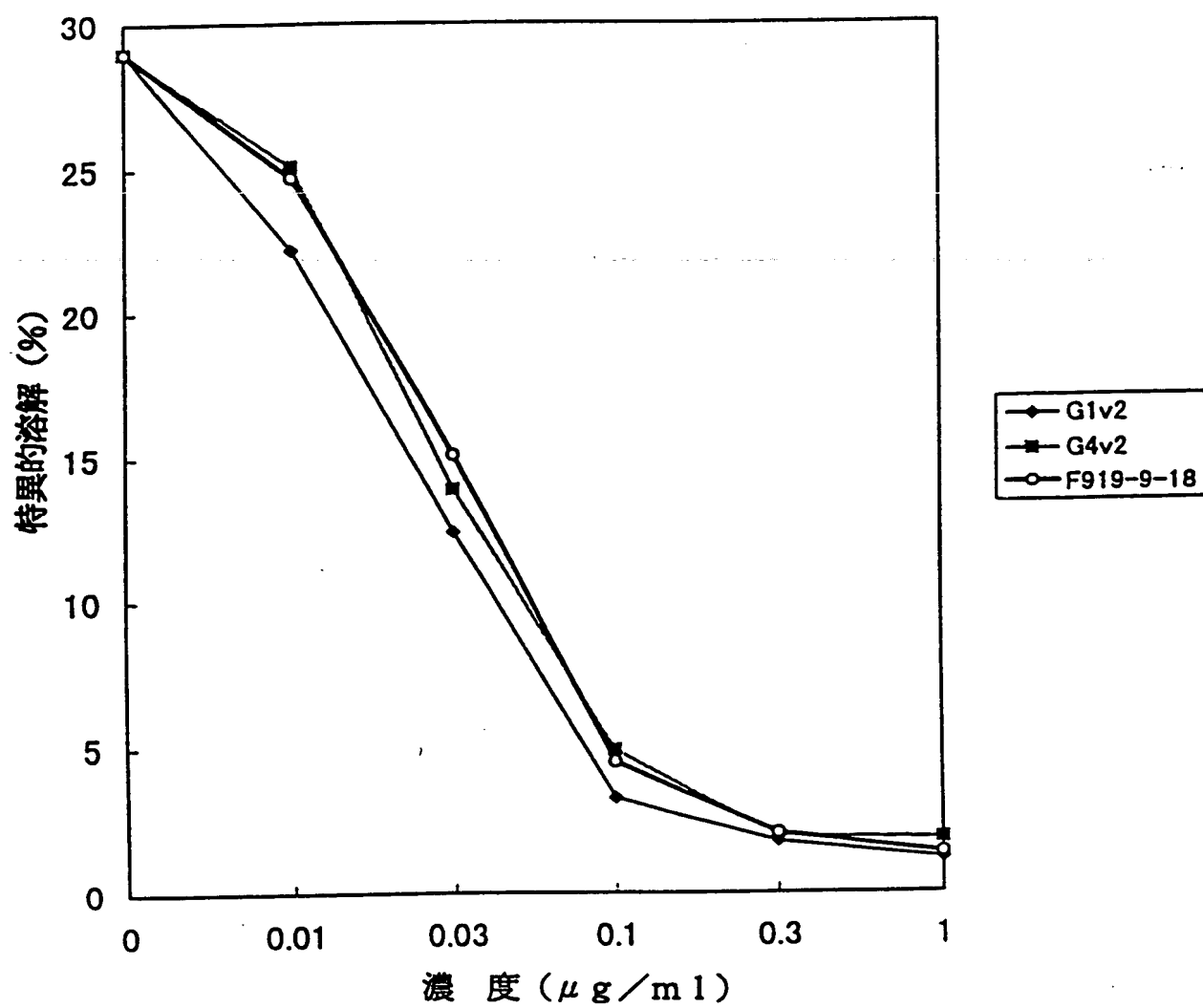
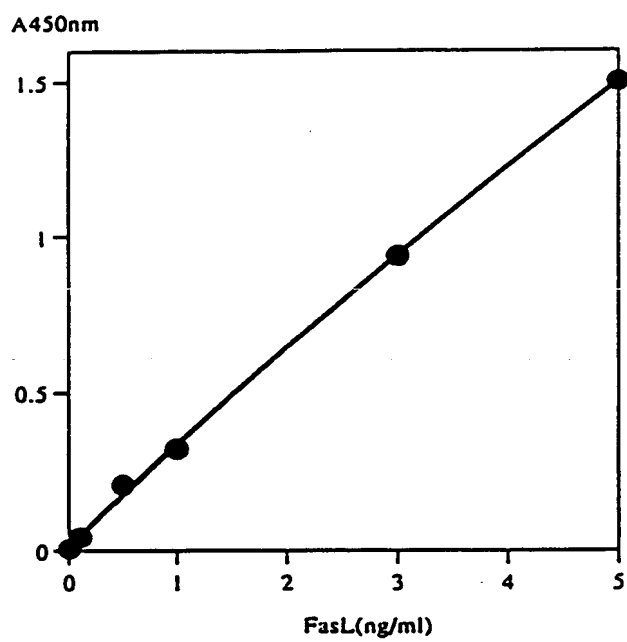




Fig. 18



標準曲線

2

3

4

Fig. 19

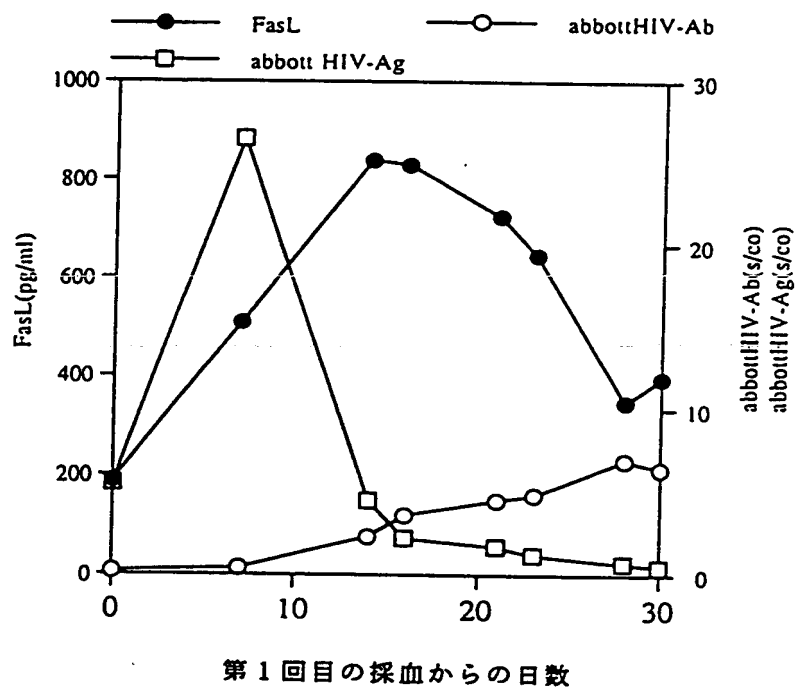






Fig. 20

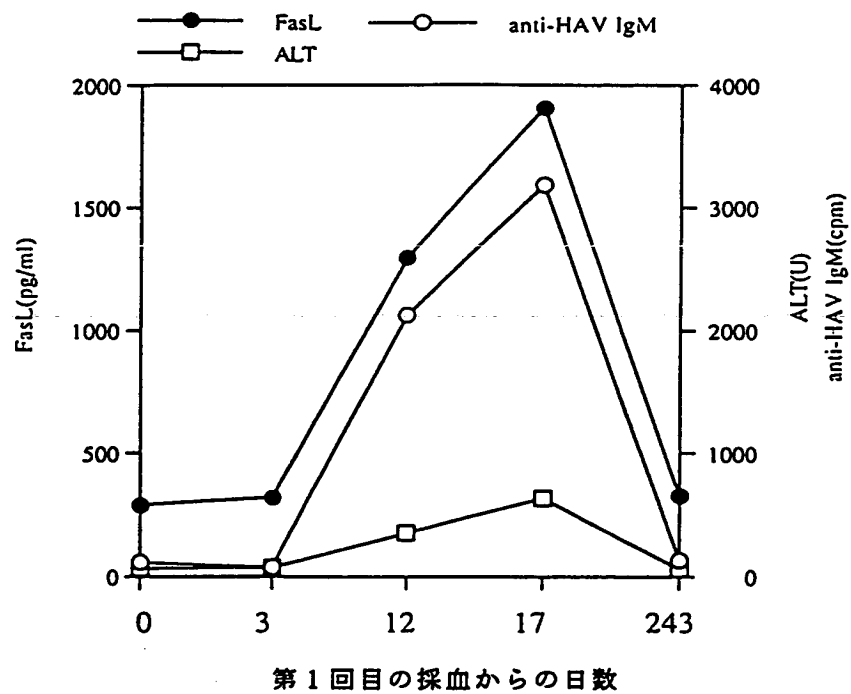




Fig. 21

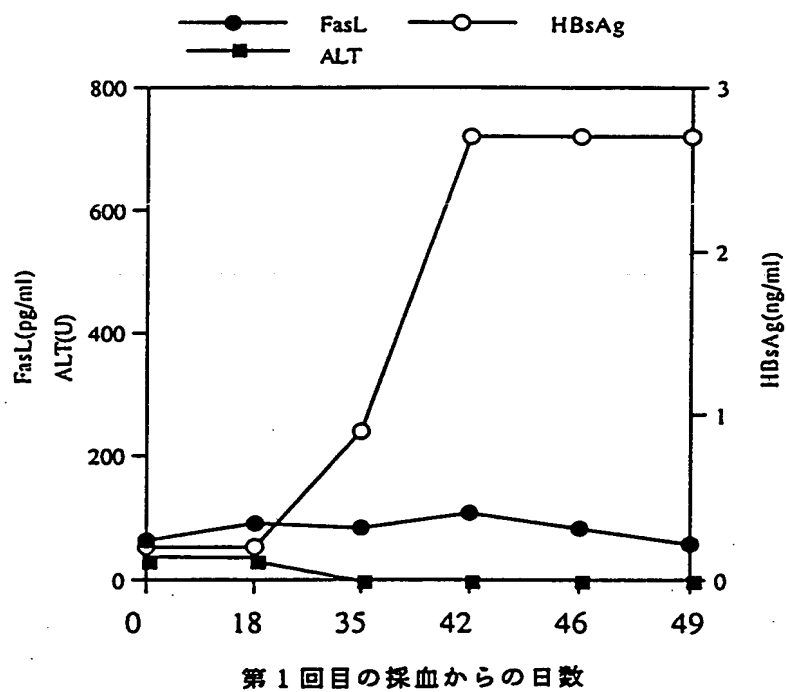
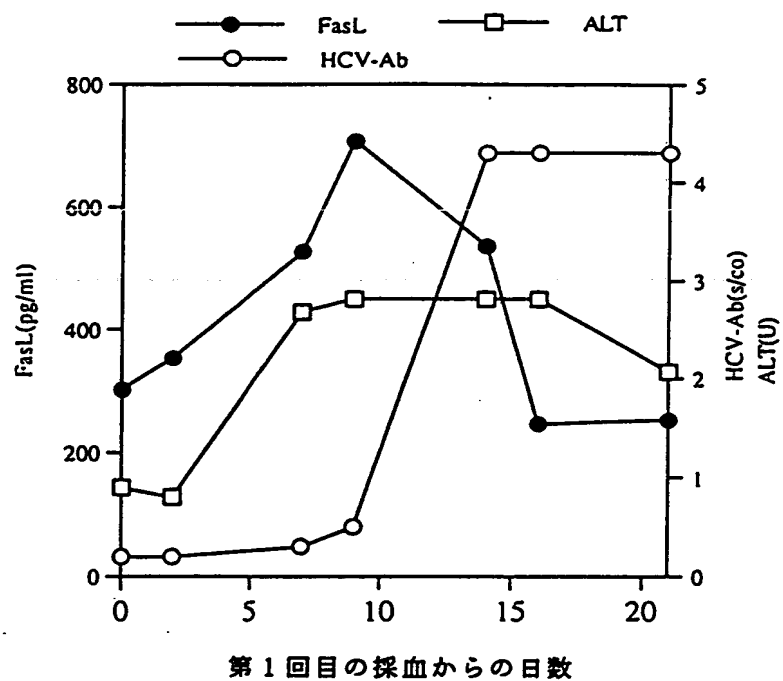




Fig. 22





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01820

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C07K16/18, G01N33/53, G01N33/577, C12N5/20 // C12P21/08,  
C12N15/06, A61K39/395, (C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/02, 15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 95/13293, A (Mochida Pharmaceutical Co., Ltd.), May 18, 1995 (18. 05. 95) & EP, 675200, A & AU, 9481158, A & JP, 8-127594, A	1-5, 9-23, 25, 27, 29, 30 6-8, 24, 26
A		
P,X	KAYAGAKI, N. et al. "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand", J. Exp. Med. (Dec. 1995) Vol. 182, No. 6, p. 1777-1783	1-5, 9-23, 25, 27, 29, 30
P,X	MARIANI, S. M. et al. "Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases", Eur. J. Immunol. (Aug. 1995) Vol. 25, No. 8, p. 2303-2307	9, 12-15, 17-19, 22, 25, 27, 29, 30

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

September 24, 1996 (24. 09. 96)

Date of mailing of the international search report

October 8, 1996 (08. 10. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01820

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 28  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The invention according to the above Claim pertains to methods for treatment of the human or animal body by therapy.
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C07K16/18, G01N33/53, G01N33/577, C12N5/20 // C12P21/08, C12N15/06, A61K39/395  
(C12P21/08, C12R1:91)

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>°</sup> C12P21/00, 21/02, 21/08, C12N15/02 - 15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS, WPI, WPI/L

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 95/13293, A (持田製薬株式会社) 18.5月.1995 (18.05.95) &EP, 675200, A &AU, 9481158, A &JP, 8-127594, A	1-5, 9-23, 25, 27, 29, 30 6-8, 24, 26
P, X	KAYAGAKI, N. et al. "Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand", J. Exp. Med. (Dec. 1995) 第182巻, 第6号, p. 1777-1783	1-5, 9-23, 25, 27, 29, 30
P, X	MARIANI, S. M. et al. "Regulation of cell surface APO-1/Fas (CD95) ligand expression by metalloproteases", Eur. J. Immunol. (Aug. 1995) 第25巻, 第8号, p. 2303-2307	9, 12-15, 17-19, 22, 25, 27, 29, 30

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献  
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日  
24.09.96

国際調査報告の発送日 08.10.96

国際調査機関の名称及びあて先  
日本国特許庁 (ISA/J P)  
郵便番号100  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
佐伯 裕子  
4 B 9358  
電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査がでしといときの意見 (第1ページの1の続き)

法第8条第3項(PCT17条(2)(a))の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 28 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
上述の請求の範囲に記載された発明は、人又は動物の身体の治療による処置方法に関するものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの2の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。